

DIE BESTIMMUNG DES HA-ANTIGENS
MIT DER KOMPLEMENTBINDUNGSREAKTION
IN EINEM AUTOANALYZER-SYSTEM

KARIN EHRKE

1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Fachbereichsdekan: Professor Dr. J. Fischer
Referent: Professor Dr. Dr. Meyer zum Büschenfelde
Korreferent: Professor Dr. P. Schoelmerich
Tag der mündlichen Prüfung: 6. März 1974

Gesamtherstellung



DITTERS BÜRODIENST

6501 HEIDESHEIM/RHEIN

AM KAPELLCHEN 1 · RUF 0 61 32 / 57 11



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. ERGEBNISSE	12
I. Zum Methodischen	12
II. Zu den gepoolten Seren	26
III. Zu den Patienten-Seren	27
C. DISKUSSION	31
I. Diskussion zur Methode	32
II. Diskussion zur Untersuchung am Spendergut	33
III. Diskussion zur Untersuchung bei Patienten mit Lebererkrankungen	33
D. LITERATURVERZEICHNIS	44

A. EINLEITUNG

Die Hepatitis ist eine der ältesten Krankheiten in der Geschichte der Medizin. Durch die weitverbreitete Anwendung von Bluttransfusionen im II. Weltkrieg wurde sie danach zu einer sorgfältig erforschten Krankheit. Seitdem bemüht man sich, den Erreger der Hepatitis zu identifizieren.

1965 fanden BLUMBERG und Mitarbeiter (10) im Blut von zwei polytransfunden Patienten einen Antikörper gegen ein elektrophoretisch im α_2 -Bereich wanderndes Antigen. Sie entdeckten dieses Antigen zufällig bei ihren Untersuchungen über neue Serum-Lipoprotein-Allotypen (10, 11).

Antigen-Forschung

Dieses Antigen wurde erstmals bei einem australischen Ureinwohner gefunden und deshalb als Australia(Au)-Antigen bezeichnet. Ursprünglich glaubten die Autoren, ein "neues Antigen in Leukämie-Seren" (10) entdeckt zu haben, weil gerade Patienten mit akuter und chronischer Leukämie dieses Antigen bevorzugt zeigten. Später konnten OKOCHI und MURAKAMI (62) die Assoziation dieses Serumfaktors mit der akuten Virushepatitis eindeutig feststellen. PRINCE (66, 67) bewies zur gleichen Zeit die Identität dieses Hepatitis-Antigens mit dem BLUMBERG'schen Australia-Antigen (Au-Ag). Er wies es im Prodromal-Stadium der Serumhepatitis nach, nicht aber bei der Hepatitis infectiosa (Hepatitis epidemica) und bezeichnete es als SH/Antigen. Über ein weiteres "Hepatitis-Antigen" haben GÖCKE und KAVEY (31) 1969 berichtet. Auch dieses Antigen scheint mit BLUMBERG's Australia-Antigen und PRINCE's SH/Antigen identisch zu sein. Kürzlich erschienene Arbeiten lassen vermuten, daß diese beiden Antigene identisch sind (67), und daß das Antigen einem Viruspartikel oder sogar dem Erreger der Serumhepatitis entsprechen könnte (3, 5).

Nachdem ursprünglich von der Arbeitsgruppe BLUMBERG's nur eine Spezifität des Antigens (Au(1)) beschrieben wurde, fand man bald darauf eine weitere Spezifität (LEVENE und Mitarbeiter (50)), die Au(2) bezeichnet wurde. Es gelang, durch Kaninchen-Immunisierung ein Anti-Serum der Spezifität Anti-Au(2) zu erzeugen.

Die Antigene Au(1) und Au(2) zeigten partielle immunologische Identität, und man nahm an, daß Au(1) die Spezifitäten a und c besitze, während Au(2) a- und b-Spezifität zeige.

Das HA-Antigen, das auf etwa 20 nm großen, sphärischen Partikeln mit einer Schwebel-

dichte von $1,16 \text{ g/cm}^3$ und einer Sedimentationskonstante von 34 S lokalisiert ist (35), galt lange Zeit als immunologisch monospezifisch reagierende Substanz. Erst in den letzten beiden Jahren häuften sich Beobachtungen über eine im Immun-Diffusionstest anhand von Spornbildungen feststellbare serologische Heterogenität des Antigens (4, 15, 16, 35, 45, 50, 51, 71, 88).

Auf der "Second Working Conference on Antigenic Subtypes of Australia Antigen" im Dezember 1971 wurde über den derzeitigen Stand der Forschung auf diesem Gebiet berichtet. Danach besitzen die bisher untersuchten HA-Antigene eine gemeinsame Antigen-Determinante "a", außerdem im allgemeinen die Determinanten "d" oder "y".

HA-Antigen der Zusammensetzung "ad" wird als "D", solches der Kombination "ay" als "Y" bezeichnet.

Weiterhin werden die Antigen-Determinanten "w" und "r", "x" beschrieben (16, 51, 79).

Nomenklatur

Gebräuchliche Bezeichnungen für das Australia-Antigen sind Australia/Serum-Hepatitis Antigen (Au(SH)Ag), Hepatitis-assoziiertes Antigen mit der Abkürzung HAA oder HA-Antigen (7) und Hepatitis B Antigen (HB-Antigen).

Immunkomplex

Von großer Bedeutung war die Entdeckung, daß im Serum eines Patienten Antigen und Antikörper gleichzeitig vorkommen können, und zwar als Immun-Komplex; wobei sowohl das Antigen als auch der Antikörper im Überschuß vorliegen können. ALMEIDA und WATERTON haben diese Ergebnisse durch elektronenmikroskopische Untersuchungen gewonnen (2). Von MILLMAN und Mitarbeitern (55) konnte dieser Befund bestätigt werden. SHULMAN und BARKER (82) führen die antikomplementäre Aktivität zahlreicher Hepatitis-Seren auf die Anwesenheit von Immunkomplexen zurück. Man findet sie besonders häufig bei chronischen Hepatitiden (25, 58, 87).

Antikörperforschung

Zum Nachweis des HA-Antigens werden sowohl Antiseren menschlichen als auch tierischen Ursprungs verwendet. Die Iso-Antikörper werden überwiegend von multitransfundierten Patienten, insbesondere von Hämophilen, gewonnen (10).

Die ersten Erfolge bei der Herstellung von Anti-HAA beim Tier wurden von MELARTIN und BLUMBERG (53) durch Kaninchen-Immunisierung erzielt. Über weitere tierische Anti-Seren haben SHULMAN und BARKER (82) - Antikörper von 2 von 8 Schimpansen, die

mit Schimpansenblut transfundiert worden waren -, BECKER und Mitarbeiter (6) - Antikörper bei Kaninchen, Ziegen, Makaken -, MILLMAN und Mitarbeiter (57) - Antikörper in Mäuse-Aszitesflüssigkeit nach Immunisierung - berichtet.

Außerdem wurden spezifische Anti-Seren durch Pferde-Immunisierung hergestellt (28).

Wir arbeiten in unserem Institut mit Meerschweinchen-Serum der Firma ABBOTT und tierischem Anti-Serum vom Baboon (Parvian) der Firma IMMUNO.

Vorkommen des HA-Antigens

Ausgehend von der Hypothese, daß das HAA mit einem Virus identisch sein könnte, teilen BLUMBERG und Mitarbeiter (14) den Kreis HAA positiver Personen in vier Kategorien ein:

1. Patienten mit einer klassischen akuten Virus-Hepatitis,
2. Patienten mit einer persistierenden, chronischen Hepatitis,
3. Patienten mit einer Schwäche des Immunsystems M. Langdon Down, Leukosen, lepromatöser Lepra und chronischen Nierenkrankheiten,
4. Personen ohne klinische Zeichen einer Hepatitis.

Die unterschiedliche Reaktion des menschlichen Organismus auf das infektiöse Agens wird mit Wirts- und Umweltfaktoren erklärt (13, 29, 43, 79).

Frequenz des HA-Antigens bei verschiedenen Erkrankungen

Von zahlreichen Autoren, insbesondere von BLUMBERG und seinen Mitarbeitern, wurde eine Reihe von Krankheitsgruppen auf die Häufigkeit und Verteilung des HA-Antigens untersucht (9, 12). Die bei verschiedenen Erkrankungen gefundenen Antigenfrequenzen sind in Tab. 1 und 2 dargestellt. Relativ hohe Antigenfrequenzen findet man bei akuter myeloischer Leukämie (8 %), akuter lymphatischer Leukämie (10 %), Hodgkin'scher Erkrankung (13 %), bei hospitalisierten Langdon Down-Patienten (28 %) (23) und bei lepromatöser Lepra (9,4 %).

Als Häufigkeiten des Vorkommens von HA-Antigenen bei Lebererkrankungen werden in einer Studie der Göttinger Universitätsklinik (42) genannt:

Bei akuter Hepatitis 75 - 100 %, bei chronischer Hepatitis (chronisch-persistierende und chronisch-aggressive) 66 %, bei Leberzirrhosen 45 %.

HA-Antigene verschiedener Populationen

Bei Untersuchungen über die unterschiedliche HAA Frequenz innerhalb der Bevölkerung

verschiedener geographischer Regionen konnte festgestellt werden, daß die ermittelten Frequenzwerte in den untersuchten gesunden Bevölkerungsgruppen zwischen 0,1 % und 20 % schwanken. Die Tabellen 3 und 4 geben die Antigenfrequenzen in verschiedenen Populationen, auszugsweise nach BLUMBERG, SUTNICK und LONDON (12) wieder. Für Amerika (USA) lagen die Durchschnittswerte zwischen 0 - 0,5 % (meist Blutspender), für Europa zwischen 0,1 und 1 %, für Japan bei 1 % (Blutspender), während sie bei einigen ostasiatischen, afrikanischen und indianischen Populationen bis zu 20 % erreichten.

Familiäre Häufungen wurden von den Arbeitsgruppen BLUMBERG's bei einigen Volksgruppen auf den Philippinen (Cebu), den Marshall-Inseln (Rongelap), in Neu-Guinea (Bougainville), in Peru (Balta) und in Philadelphia festgestellt. Sie führten zur Annahme eines autosomalen rezessiven Erbganges (8).

Diese Autoren konnten auch bestätigen, daß das männliche Geschlecht, unabhängig von der geographischen Verteilung und Grundkrankheit, häufiger das Antigen aufweist als das weibliche. Bisher konnte dafür keine Erklärung gefunden werden (8).

Die Differenzen in den Zahlenangaben verschiedener Autoren bei Untersuchungen gleicher Kollektive bzw. Untersuchungen aus gleichen geographischen Regionen, wie sie in Tabelle 4 dargestellt sind, können durch mehrere Umstände erklärt werden:

1. Methodische Unterschiede in der Empfindlichkeit und Spezifität.

Verschiedene Nachweismethoden können zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Darüber hinaus kann sogar bei einer Testmethode mit differenten Ergebnissen gerechnet werden (24, 76).

2. Unterschiedliche Spezifitäten der Antikörper.

Nach LEVENE und BLUMBERG (50) und anderen Autoren (4, 15, 16, 35, 45, 50, 51, 71, 79, 88) ist mit unterschiedlichen Spezifitäten der Antikörper zu rechnen.

Die unter 1. und 2. erwähnten Schwierigkeiten sind nur durch ein international standardisiertes Testsystem zu beseitigen.

3. Heterogenität des Untersuchungsmaterials.

Der Zeitpunkt und die Zahl der Blut-Abnahmen während eines Krankheitsverlaufs spielen eine große Rolle für die Nachweisbarkeit des Antigens, weil das HA-Antigen bei der akuten Hepatitis nur im frühen Stadium der Erkrankung nachweisbar sein soll (20, 29, 34, 38, 46, 62, 66, 100). So kann das Material bei gleichartigen Kollektiven und sogar von ein und demselben Menschen uneinheitlich sein.

Nachweismethoden für das HA-Antigen

Ein wichtiges Kriterium der Leistungsfähigkeit einer Methode ist ihre Empfindlichkeit oder Sensibilität. Sie ist nur dann als wirklich positiv zu beurteilen, wenn die erhobenen Befunde gleichzeitig spezifisch sind.

Unter der Voraussetzung der Spezifität gilt die Empfindlichkeitssteigerung, wie sie bei den verschiedenen Methoden angegeben wird, als größere Leistungsfähigkeit der Methode.

1. Agargel-Immun-Diffusion (ID) (Ouchterlony-Test)

Mit diesem Test wurde das Antigen entdeckt und in den ersten Jahren ausschließlich bearbeitet. Der Test wird von verschiedenen Autoren mit unterschiedlichen Puffersystemen durchgeführt (11, 66). Allerdings ist die Methode wenig empfindlich, und die Präzipitationslinien werden erst nach zwei bis drei Tagen sichtbar. Nach BECKER (6) und Mitarbeitern können durch Mikromodifikationen des Tests die Empfindlichkeit gesteigert und die Diffusionszeit verkürzt werden.

2. Immun-Präzipitations-Elektrophorese (IPE)

Diese ursprünglich in der forensischen Medizin angewandte Methode (22) wurde von PSENDORFER et al (65) sowie von GÖCKE und HOWE (33) für den HAA-Test eingeführt. Das Prinzip ist, die in einem Serum befindlichen Antigene oder Antikörper in Agar oder Agarose zur Anode bzw. Kathode wandern zu lassen. Durch entsprechende Anordnung der Standard-HAA- und Anti-HAA-Seren werden die Antigene im Anodenbereich, die Antikörper im Kathodenbereich sichtbar gemacht. Diese Methode bietet gegenüber dem Ouchterlony-Test den Vorteil, daß bereits nach ein bis drei Stunden ein Ergebnis vorliegt. Die Empfindlichkeit wird als zehnfach besser bei gleich guter Spezifität eingeschätzt (7).

3. Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR)

Die Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR) wurde von SHULMAN und BARKER (82) für den HAA-Nachweis eingesetzt. Sie gehört zu den sensibelsten Nachweismethoden und ist der Immun-Diffusion um das Hundert- bis Zweihundertfache überlegen (20, 40, 70, 78, 81, 82, 85). Sie ermöglicht die exakte Titration des Antigens gegen ein Standard-Anti-HAA-Serum oder des Antikörpers gegen das Standard-HAA-Serum (82). Bekannt sind die manuelle (19) und die automatische Technik der KBR. Erst nach den kinetischen Versuchen von VARGUES und Mitarbeitern (72, 92, 95) mit der automatischen

Komplement-Fixation gewann diese Methode für den Australia-Nachweis im Technicon AutoAnalyzer-System besondere Bedeutung.

Wie die Autoren an Titervergleichen (40, 52, 76) mit HA-Antigen positiven Seren zeigen konnten, ist sie wesentlich empfindlicher als die Immun-Diffusion und die Immun-Präzipitations-Elektrophorese (85, 86, 96). Auch mit dieser Methode kann innerhalb von wenigen Stunden ein Ergebnis erzielt werden; sie ist aber im Gegensatz zur IPE in der Vorbereitung und Ausführung wesentlich aufwendiger. Weitere für eine Routineanwendung limitierende Faktoren sind Prozoneneffekte und mögliche antikomplementäre Eigenschaften der zu untersuchenden Seren. Hinzu kommen der relativ große Verbrauch an Testseren und der Mangel an brauchbaren Antiseren (7, 28).

4. Elektronenmikroskopie

Zur elektronenmikroskopischen Darstellung wird das Antigen entweder durch Dichtegradienten-Zentrifugation oder durch Präzipitation mit einem spezifischen Antikörper isoliert (3, 44).

5. Fluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe dieser Methode kann das Antigen in Körperzellen dargestellt werden (21, 56, 60, 61). Dazu muß der spezifische Antikörper isoliert und mit einem Fluoreszenzstoff, Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt werden.

Mit dieser Methode konnte MILLMAN et al erstmals das HA-Antigen in Leberzellkernen bei HAA positiven Patienten, aber auch bei 15 von 35 sero-negativen Fällen nachweisen (56). Bei der Untersuchung von autopsisch gewonnenen Organen eines HAA positiven Patienten mit Mongolismus und akuter Leukämie konnte mit diesem Test das Antigen auch in den Zellen des Knochenmarks, der Milz und der Testes nachgewiesen werden (21).

6. Radio-Immunologischer Nachweis

Mit dieser äußerst empfindlichen radioimmunologischen Untersuchungsmethode nach WALSH und Mitarbeitern (98) kann das HA-Antigen nachgewiesen werden. Diese Autoren haben gereinigtes mit 125 I markiertes Antigen für ihre Untersuchungen verwendet.

7. Hämagglutination

In diesem von VYAS und SHULMAN (97) entwickelten Test werden rote Blutkörperchen mit dem Au-Antigen sensibilisiert und durch den Antikörper zum Agglutinieren gebracht.

Diese Methode gehört zu den empfindlichsten Nachweisverfahren; nach SHULMAN beträgt sie das Zweitausendfache der Immun-Diffusion (81).

Zum Nachweis des HA-Antigens wird die Menge Antigen im Serum ausstitriert, die ein Standard-Anti-HAA-Serum zu neutralisieren und damit die Hämagglutination zu inhibieren vermag.

Auf die sonst im Schrifttum aufgeführten Methoden soll hier nicht näher eingegangen werden. Sie stellen entweder Modifikationen oben aufgeführter Tests dar oder erfordern aufgrund ihres erheblichen technischen Aufwandes Spezial-Laboratorien (6, 68, 75, 98, 99).

Beziehungen des HA-Antigens zur Virushepatitis

Die Ansichten, wonach das HAA mit dem oder einem Hepatitisvirus identisch sei, tragen vorläufig noch hypothetischen Charakter und sind nicht unwidersprochen geblieben. Die Rolle des HA-Antigens als Indikator-Antigen für eine Infektion mit dem Erreger der Hepatitis-B ist inzwischen fast unbestritten (29, 47, 69). Es gibt jedoch eindeutige Beziehungen des HA-Antigens zur Virushepatitis (28):

1. Patienten mit einer akuten Virushepatitis zeigen in einem hohen Prozentsatz HAA.
2. Bei der akuten Hepatitis erscheint das Antigen in einem frühen Stadium (Prodromalstadium bzw. Inkubationszeit) und verschwindet in der Regel nach wenigen Wochen wieder (42, 59). Diese Verhältnisse lassen an Beziehungen zu einer Virämie im Verlaufe einer Virusinfektion denken (28).
3. Die spezifische Zuordnung des HA-Antigens zur Serum-Hepatitis wurde neuerdings dadurch gefestigt, daß bei lokalem Hepatitis-B Ausbruch nur HA-Antigene eines bestimmten Subtyps "D" oder "Y" gefunden wurden, der sonst dort regional nicht dominierte (Willowbrook-Studie, Göttinger Studie) (29, 43, 79).
4. Das Antigen ist auch bei chronischen Hepatiserkrankungen nachweisbar, insbesondere bei der chronisch - aggressiven, aber auch bei der chronisch-persistierenden Hepatitis und bei Leberzirrhosen (17, 30, 42, 59, 80, 87). Von verschiedenen Untersuchungsgruppen wird ein Zusammenhang zwischen anhaltendem HAA-Nachweis im Blut und dem Übergang einer akuten Hepatitis in eine chronische Form angenommen (25, 26, 46, 100).
5. Wie bei anderen Virus-Infektionen gelang neben dem Nachweis der humoralen Immunität auch der Nachweis der zellulären Immunität in einem in vitro Versuch an sensibilisierten Lymphozyten (1, 27, 45, 48, 54).

6. Es besteht ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Nachweis des Antigens und der Infektiosität des Blutes (29, 31, 34, 39, 62, 63, 64, 83).

Mehrere Autoren haben gezeigt, daß Empfänger von HAA positivem Blut in einem hohen Prozentsatz eine Hepatitis entwickeln, aber nur ein kleiner Prozentsatz der Empfänger von HAA negativem Blut (64). OKOCHI und Mitarbeiter (63) fanden, daß 33 % der Empfänger HAA positiven Blutes ebenfalls positiv wurden und in den meisten Fällen eine Hepatitis entwickelten. Nach GÖCKE und KAVEY (32, 34) entstand bei 75 % der Empfänger HAA positiven Blutes eine Hepatitis.

7. Häufungen HAA positiver Personen, wie sie in tropischen und südostasiatischen Regionen vorkommen, lassen unter epidemiologischen Gesichtspunkten vermuten, daß sie durch unzureichende sanitäre Verhältnisse zu erklären sind, wobei auch eine Übertragung durch Moskitos und andere Insekten diskutiert wird (14).
8. Häufiges Auftreten des HA-Antigens und Hepatitisinfektionen bei Patienten und Personal von Hämodialyse-Zentren wurden beobachtet (43, 73, 89).
9. Hohes Molekulargewicht, Form und Größe des HAA-Partikels, Stabilität gegen verschiedene chemische und physikalische Einflüsse und Lagerungsstabilität sind virusähnliche Eigenschaften (3, 7, 82).

Praktische Bedeutung des HAA-Nachweises

BLUMBERG und Mitarbeiter schlagen vor, den Nachweis des HAA und des Anti-HAA für die klinische Praxis einzuführen (14):

1. Zur routinemäßigen Kontrolle der Blutspender,
2. zur Erfassung chronisch-antikörperlicher Hepatitisfälle,
3. zur Erfassung klinisch gesunder Hepatitisvirusträger,
4. zur routinemäßigen Kontrolle von Patienten und Personal in Hämodialyse-Einrichtungen,
5. zur Verlaufs-Kontrolle bei akuten und chronischen Hepatitis-Erkrankungen.

Die Forderungen mehrerer Forschergruppen nach routinemäßiger Kontrolle der Blutspender mit dem Ziel, HAA positive Spender nicht mehr zum Spenden zuzulassen (14, 18, 31, 34, 42, 46, 62, 64, 65, 68, 73, 74, 89), werden auch von uns unterstützt.

Eigene Fragestellung:

Auf der Suche nach empfindlicheren und spezifischen Nachweis-Methoden des HA-Antigens zur routinemäßigen Kontrolle (64) der Blutspender und Patienten bedienten wir uns der KBR

im AutoAnalyzer-System. Diese Komplement-Bindungs-Reaktion spielt bisher in den Blutspendediensten (56, 77) eine untergeordnete Rolle, obwohl sie zu den sensibelsten Nachweis-Methoden zählt (20, 24, 36, 70, 76, 78, 82, 85, 96).

Für die KBR im AutoAnalyzer-System werden mehrere Versuchsanordnungen mitgeteilt (19, 37, 72, 90, 92, 93). Sie arbeiten alle nach dem Prinzip der Komplement-Bindung durch den Antigen-Antikörper-Komplex, photometrische Messung des Hämolysegrades und Registrierung auf einem Schreiber. Sie unterscheiden sich aber in der Anordnung und Anzahl von Probeteller, Proportionierpumpe, Heizbad und Durchflußvolumina des Schlauch- und Reaktionssystems.

Den Untersuchungen liegen folgende Fragestellungen zugrunde:

1. Wie ist die Sensibilität der Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR) im AutoAnalyzer als ein wesentliches Kriterium der Leistungsfähigkeit einer Methode, verglichen mit anderen Standardmethoden, zu beurteilen?
2. Welche zusätzlich diagnostisch verwertbaren Informationen bietet die Methode?

Material

1. Flüssiges Meerschweinchen-Serum als Komplementquelle (Präparat der BEHRING-Werke). Im Reaktionsansatz wird stets eine 100 %ige Hämolyse-Einheit, d. h. 1 C_H100 Einheit verwendet.
2. Konservierte Hammelblut-Erythrozyten (Präparat der BEHRING-Werke oder der BIOLOGISCHEN ARBEITSGEMEINSCHAFT in Lich). Es wird eine 1 %ige Erythrozyten-Konzentration benutzt.
3. Der Ambozeptor, Titer 1:4000 (Hämolisierendes Anti-Hammelserum), Präparat der BEHRING-Werke. Es wird in einer Verdünnung 1:2000 verwendet.
4. Isotoner Veronal-Puffer (Komplement-Puffer).
5. HAA-Anti-Serum der Firma NOTIST. HAA-Anti-Serum ist ein flüssiges, gewachtes Plasma-Serum und wurde nach dem Standard-Referenz-Panel des NIH überprüft. Außerdem sind die Serien dreifach im Schweizer Referenz-Laboratorium in Bern an 50 positiven Seren überprüft worden. Als negative Kontrollen wurden 100 Blutsamen untersucht.

HAA-Anti-Serum der Firma ABBOTT (flüssiges Meerschweinchen-Serum).

HAA-Anti-Serum der Firma IMMUNO (flüssiges Affinisches Serum von Baboon + 10%).

Sie erfassen sowohl den Subtypus "D" als auch den Subtypus "Y".

6. Untersuchungsmaterial:

Spenderseren von 45 262 Blutspendern aus Rheinland-Pfalz und dem Saarland mit je einer Untersuchung.

Seren von Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen aus der II. Med. Univ. Klinik Mainz. Das Patienten-Kollektiv umfaßt 404 Patienten mit mehreren Untersuchungen als Verlaufs-Kontrollen, insgesamt mit 1 069 Untersuchungen.

Apparate

TECHNICON AutoAnalyzer mit folgenden Geräten:

Probennehmer II

Proportionierpumpe

Wasserbad, 37° C

Photometer (Durchflußküvette 15 mm, Filter 660 nm)

Schreiber

Die Anordnung der AutoAnalyzer-Geräte ist in Abb. 1 dargestellt.

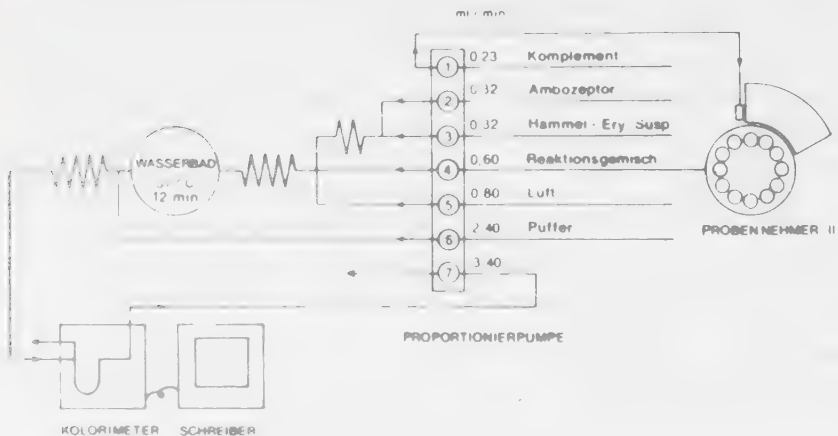


Abb. 1 KBR im AutoAnalyzer

Anordnung der Geräte (halbautomatische Technik)

Methode (Prinzip: halbautomatische Technik)

Die Antigen-Antikörper-Reaktion und die Bindung des Komplements an den Antigen-Antikörper-Komplex finden im Probebecher bei einer Temperatur von 37°C statt. Die lytische Phase und die Registrierung des Hämolysegrades erfolgen im AutoAnalyzer.

1. Inaktivieren der Seren.

Die zu untersuchenden Seren werden vor dem Ansatz für 30 Min. bei 56°C inaktiviert.

2. Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes.

Im Probebecher werden 50 μl Probandenserum und 50 μl Antikörper gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Min. bei 37°C werden 100 μl Komplement hinzugefügt.

3. Komplement-Fixation an den Antigen-Antikörper-Komplex.

Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 Min. bei 37°C werden dem Reaktionsgemisch 230 μl Komplementpuffer hinzugefügt und zusammen mit dem hämolytischen System (Hammelblut-Erythrozyten und Ambozeptor - EA -) in den AutoAnalyzer gepumpt.

4. Die lytische Phase.

Sie dauert 12 Min. bei 37°C im Wasserbad. Der Grad der Hämolyse wird in unserem System durch die Messung der Trübung (Photometer 660 nm) ermittelt.

5. Mitführen geeigneter Kontrollen.

Es werden Anti-Serum-Eigenkontrollen in der benutzten Anti-Serum-Verdünnung, sowie Eigenkontrollen des Probanden-Serums zur Feststellung möglicher antikomplementärer Wirkungen mitgeführt.

Die Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR) ist in der nachfolgenden Tabelle noch einmal für HAA positive und HAA negative Seren schematisch dargestellt.

Reaktionsschema

Positive Reaktion

50 μl HAA pos. Serum
+
50 μl HAA-Anti-Serum
+
100 μl Komplement
+
230 μl Komplementpuffer
+
320 μl Hämolytisches System (EA)
↓
Trübung

30 Min. 37°C
Bildung des Ag/Ak-Komplexes
↓
30 Min. 37°C
Komplement-Bindung
↓
Verdünnung
↓
12 Min. 37°C
lytische Phase
↓
photometrische Messung und Registrierung

Negative Reaktion

50 μl HAA neg. Serum
+
50 μl HAA-Anti-Serum
+
100 μl Komplement
+
230 μl Komplementpuffer
+
320 μl Hämolytisches System (EA)
↓
Hämolyse

B. ERGEBNISSE

I. ZUM METHODISCHEN

Bestimmung der geeigneten Komplement-Dosis

Die geeignete Komplement-Dosis ist die Menge an Komplement, die gerade eine vollständige Hämolyse der sensibilisierten Zellen hervorruft.

Sie kann bestimmt werden durch stufenweise Komplement-Titration (93).

Abb. 2 zeigt die Titration des Komplements in einzelnen Titerstufen und den Einfluß der Komplement-Konzentration auf den Trübungsgrad des hämolytischen Systems. Bei einer Komplement-Konzentration von 1:90 erfolgt gerade eine 100 %ige Hämolyse. Sie stellt die geeignete Komplement-Dosis dar.

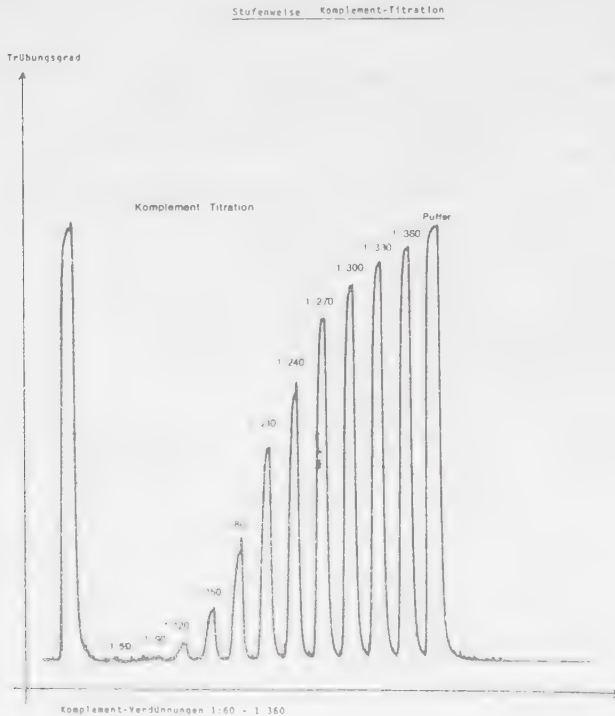


Abb. 2 Komplementtitration (Titerstufen)

Exakter läßt sich die geeignete Komplement-Dosis durch kinetische Komplement-Titration (49, 91, 94) bestimmen. Dabei wird aus einem vorgelegten Volumen (v) mit einer bestimmten Komplement-Konzentration C_0 zum Zeitpunkt t_0 , entsprechend dem Förder-Volumen des Schlauches pro Min. (x), kontinuierlich abgesaugt und die gleiche Menge an Komplementpuffer hinzugepumpt. Das Volumen bleibt immer konstant. In der Zeit (t) ändert sich nur die Konzentration des Komplements (C_t). Die Konzentrationsänderungen lassen sich mit Hilfe einer Exponentialgleichung für jeden Punkt der Kurve berechnen:

$$C_t = C_0 \cdot e^{-\frac{x}{v} t}$$

Sie gibt das Ausmaß der Komplementfixation an einen Immunkomplex in Abhängigkeit von der Zeit wieder.

In Abb. 3 ist die Versuchsanordnung für die kinetische Komplement-Titration mit Titrationskurve dargestellt.

KINETIK DER KOMPLEMENT - TITRATION

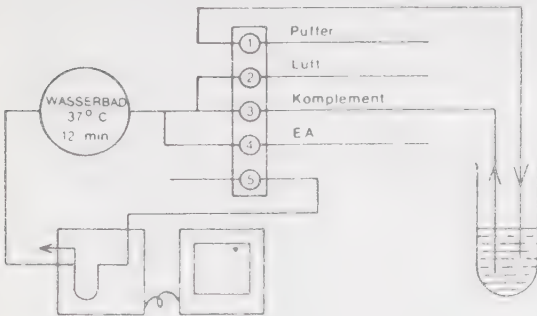
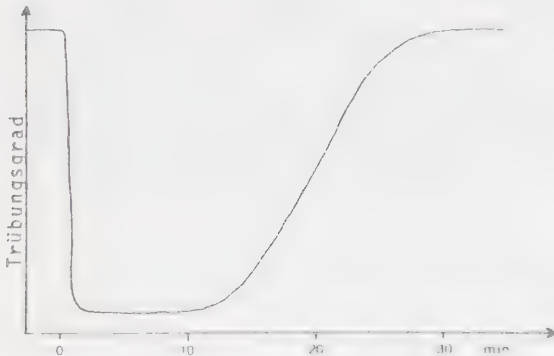


Abb. 3
Kinetische Komplement-
Titration im AutoAnalyzer
Versuchsanordnung und
Titrationskurve



Der Grad der Hämolyse, der in einem direkten Bezug zur Konzentration des Komplements steht, kann in der AutoAnalyzer-Apparatur kontinuierlich dargestellt werden. Man erhält eine Kurve, wie sie für chemische Reaktionsabläufe II. Ordnung üblich ist (Abb. 3). Da die Menge an Komplement nicht exakt festgelegt werden kann, die eine 100 %ige Lyse hervorruft, wird als Bezugswert die 50 %ige Lyse verwendet. Die Menge an Komplement, die gerade 50 % der sensibilisierten Zellen lysieren kann, ergibt eine hämolytische Einheit $C'H_{50}$ (41, 84, 91).

Da die bei dieser Reaktion verwendeten Antiseren mehr oder weniger große Mengen Komplement binden, haben wir bei der Komplement-Titration diejenige Anti-Serum-Menge zugeetzt, die auch später im Reaktionsansatz benutzt wird.

Wir arbeiten mit 2 $C'H_{50}$ Einheiten, was gleichbedeutend mit 1 $C'H_{100}$ Einheit ist.

Durch die Studien von VARGUES und Mitarbeitern wissen wir, daß die Komplement-Bindung eine kinetische Reaktion darstellt (90, 92, 93, 94, 95).

In Abb. 4 wurde bei a), b) und c) jeweils nur eine Versuchsbedingung variiert, und zwar:

- a) Menge des Antikörpers
- b) Menge des Komplements
- c) Temperatur

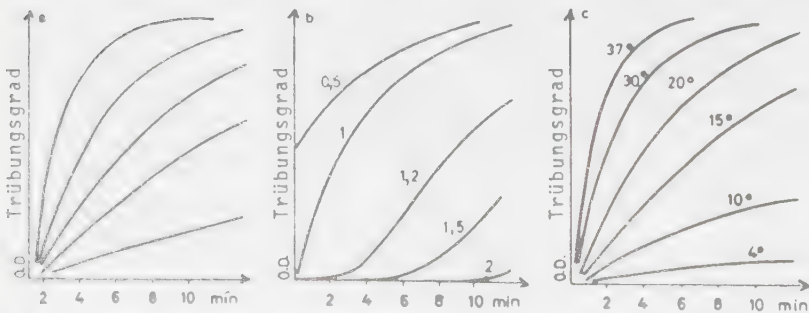


Fig. 2. Different types of kinetic curves. Curves a. The quantity of complement is constant (1 unit $C'H_{100}$), the quantity of antigen is constant, the quantity of antibodies varies from one assay to another. Curves b. The quantity of antigen is constant, the quantity of antibodies is constant, the quantity of complement is variable (from 2 units $C'H_{100}$ to 0,5 unit $C'H_{100}$). Curves c. Effect of temperature on the velocity of the complement fixation.

Abb. 3. Kinetische Kurven von Komplementbindungsreaktionen unter verschiedenen Versuchsbedingungen
(auszugsweise nach R. VARGUES (92))

Die Geschwindigkeit der Komplementfixation ist von der Menge des Antigens und des Antikörpers (Abb. 4a) abhängig. Die Steilheit der Kurve wird von der Menge des Komplements (Abb. 4b) bestimmt. Wenn eine $C'H_{100}$ Einheit Komplement benutzt wird, erhält man eine Exponentialkurve. Werden hingegen – wie bei der COLMER-Technik – zwei $C'H_{100}$ Einheiten Komplement verwendet, so ist das Ergebnis eine Sigmoidkurve. Die KBR ist deshalb wesentlich empfindlicher in der beobachteten Komplementbindungszeit von 10 Min., wenn nur eine $C'H_{100}$ Einheit Komplement benutzt wird (92).

Die Untersuchungen von VARGUES und Mitarbeitern bewiesen gleichzeitig, daß die Kinetik der KBR von der Temperatur abhängig ist (Abb. 4c). Innerhalb von wenigen Minuten werden bei einer Reaktionstemperatur von $37^{\circ}C$ optimale Ergebnisse erreicht. Bindungstemperaturen von $4^{\circ}C$ benötigen nicht nur längere Arbeitszeiten, sondern führen auch zu unkontrollierbaren Komplementverlusten, die von Untersuchungsansatz zu Untersuchungsansatz unterschiedlich sein können.

Auf der Suche nach einer optimalen Methode zur Bestimmung des HA-Antigens wurde in unserem Institut eine kinetische Analyse zur Komplement-Fixation durch den HA-Antigen-Antikörper-Komplex im AutoAnalyzer durchgeführt.

Die Versuchsanordnung, dargestellt in Abb. 5, wurde einer Studie von VARGUES entnommen (92, 95).

Der Einfluß der einzelnen Reaktionspartner (Komplement, Antigen und Antikörper) auf die Bindung des Komplements kann unter verschiedenen Versuchsbedingungen untersucht und kontinuierlich dargestellt werden (92, 95).

Antigen, Antikörper und Komplement werden in einem Reagenzglas gemischt. Es wird immer nur ein Reaktionspartner variiert, während die übrigen und die Versuchsbedingungen konstant gehalten werden.

Das Gemisch wird zusammen mit dem hämolytischen System (EA) in den AutoAnalyzer gepumpt.

Die Festlegung der optimalen Komplement-Dosis von 1 $C'H_{100}$ Einheit erfolgt vor dem Versuch durch kinetische Titration. Die lytische Phase betrug in allen Fällen 12 Min. Es wurde die Komplement-Bindung (Fixation) ohne und mit vorheriger Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes untersucht und in Abb. 6 aufgezeichnet.

KINETIK DER KOMPLEMENT-BINDUNG

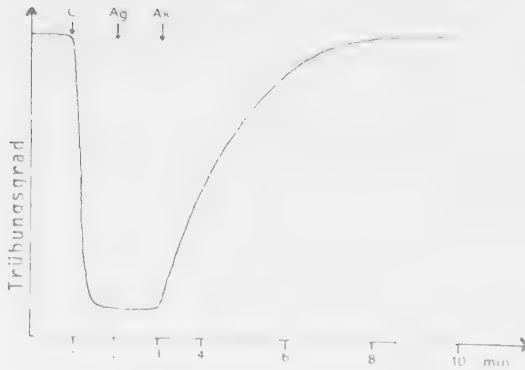
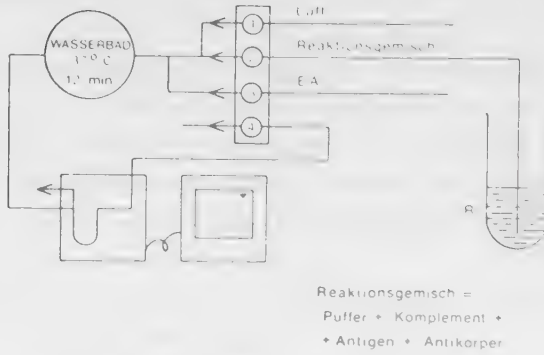
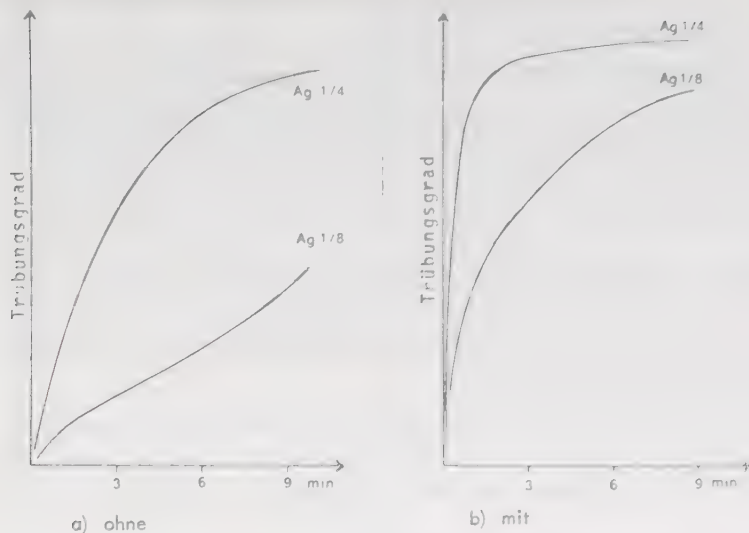


Abb. 5 Kinetik der Komplementbindung

- C = Komplement
- Ag = Antigen
- Ak = Antikörper
- E-A = hämolytisches System

Abb. 6 Komplement-Fixation für niedrig- und hochtitrige Antigene



vorheriger Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes

Allerdings wurde die Wirkung der Temperatur von $4^{\circ}C$, $20^{\circ}C$ und $37^{\circ}C$ auf die Komplement-Bindung untersucht und in Abb. 7 dargestellt.

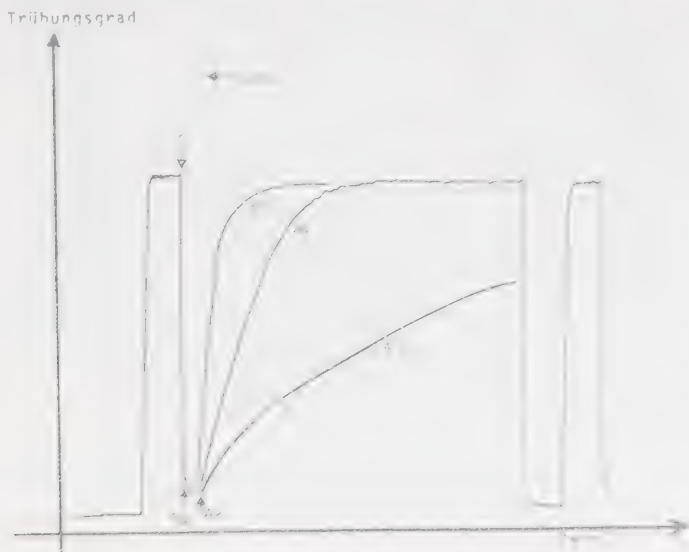


Abb. 7 Der Einfluß der Temperatur auf die Komplement-Fixation

Da die Ergebnisse die Grundlage unserer Technik der Komplement-Bindungs-Reaktion im AutoAnalyzer darstellen, sind sie hier aufgeführt:

Optimale Reaktionen, d.h. bestmögliche (maximale) Bindung des Komplements innerhalb eines beobachteten Zeitraumes werden für hoch- und niedrigtitrige HA-Antigene schon innerhalb einer Komplementbindungszeit von nur 15 - 20 Min. erreicht, wenn sich ein Antigen-Antikörper-Komplex bereits vorher während 30 Min. bei 37°C bilden konnte (Abb. 6b).

Die Reaktion ohne Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes führt in Temperaturbereichen von 4°C, 20°C und 37°C zu wesentlich schlechteren Ergebnissen, d.h. die Komplementbindung erreicht in der beobachteten Komplementbindungszeit von nur 15 - 20 Min. nicht ihr mögliches Maximum (Abb. 6a).

Durch Verlängerung der Komplementbindungszeiten könnte man auch unter anderen Bedingungen eine maximale Bindung des Komplements, d.h. optimale Ergebnisse, erreichen; jedoch darf man im AutoAnalyzer das Schlauch- und Reaktionssystem nicht ungestraft verlängern.

In Versuchsreihen mit bekannten HA-Antigenen in verschiedenen Konzentrationen konnten wir feststellen, daß im AutoAnalyzer mit den von uns verwendeten Antiseren niedrigtitrige Antigene noch erfaßt wurden, hochtitrige Antigene häufig falsch negative Ergebnisse zeigten, d.h. es traten Prozonen auf. Dieses Phänomen war also nur bei Seren mit einer starken HA-Antigen-Konzentration zu beobachten. Das HAA läßt sich dann nur nach entsprechender Verdünnung des Serums und damit erfolgt die Verdünnung des Antigens, nachweisen. Die Untersuchungen der Probandenserien werden am günstigsten unverdünnt und in Verdünnungen 1:10 und 1:100 durchgeführt. Da sich anstelle von Puffer auch inaktiviertes Serum als Verdünnungsmedium eignet, kann man für die Screening-Untersuchungen bei Blutwendern, bei denen entsprechend der niedrigen HAA-Frequenz in der Gesamtbevölkerung nur mit einer geringen Anzahl HAA positiver Befunde gerechnet werden kann, Verdünnungen mit inaktiviertem Komplementpuffer auch mit anderen inaktivierten Probandenserien vornehmen. Auf diese Weise wird Zeit und Material für die Untersuchungsansätze. Mit dieser Methode werden sowohl die hochtitrigen als auch die niedrigtitrigen Antigene erfaßt.

Alle HAA-Untersuchungen der Probandenserien werden jeweils mit zwei Anti-HAA Seren, einem menschlichen HAA-Serum und einem flüssigen tierischen Serum in der KBR vorgenommen.

ANSATZSCHEMA FÜR SPENDERSEREN

Screening

Es werden 6 inaktivierte Spenderseren zu gleichen Teilen gepoolt (je 50 µl) und von dem Gemisch 50 µl gegen ein HAA-Antiserum angesetzt.

In Abb. 8 und 9 ist das Screening von Spenderseren dargestellt. In Abb. 8 wechseln jeweils 8 HAA negative Seren mit einem HAA positiven Serum als Markierungsmarke ab.

Abb. 9 zeigt Seren ohne komplementverbrauchende - negative - und mit komplementverbrauchenden Reaktionen - als positiv gekennzeichnet - im Pool an.

Abb. 8 und Abb. 9 Screening-Untersuchung bei Blutspendern

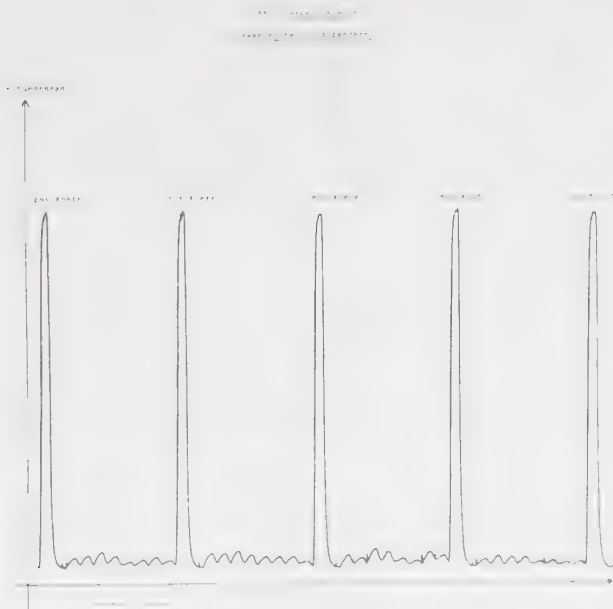


Abb. 8 HAA negative Seren mit HAA positiven Kontrollen

HAA - Untersuchungen

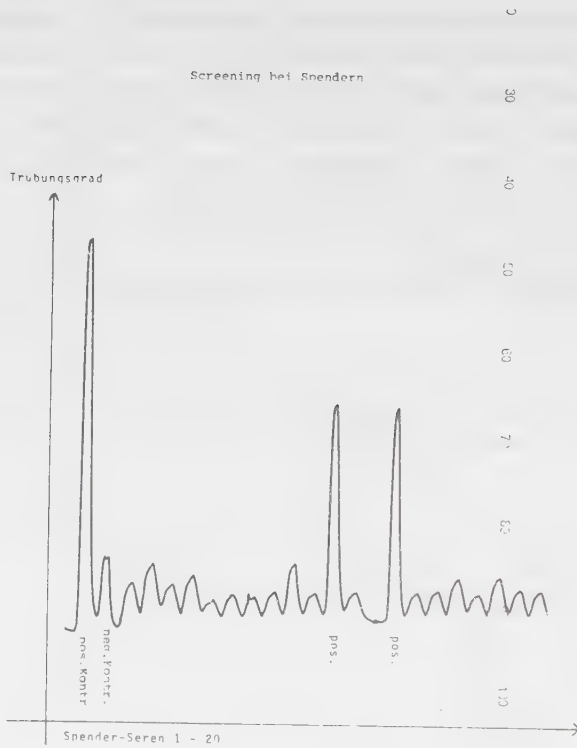


Abb. 9 Darstellung hoch- und niedrigtitriger HA-Antigene im Pool

Bei der relativ niedrigen Frequenz der HAA positiven Seren bei Blutspendern müssen nur in wenigen Fällen die Seren einzeln nachuntersucht werden.

Einzeluntersuchung

Bei einer positiven Reaktion im Pool werden die Seren im Einzel-Ansatz gegen das Anti-Serum getestet.

Titerbestimmung

Nach Auffinden eines HAA positiven Serums wird dieses austitriert und gleichzeitig auf Eigenhemmung (antikomplementäre Wirkung) untersucht.

Abb. 10 zeigt die Titration eines HAA positiven Serums mit gleichzeitiger Titration der Eigenkontrolle.

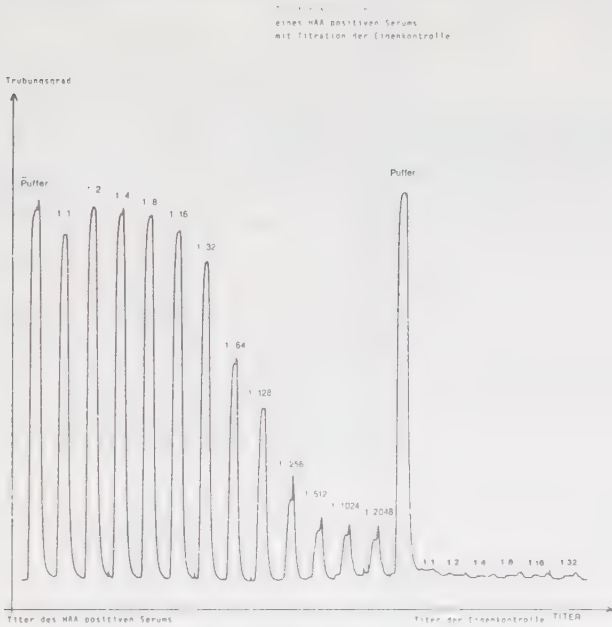


Abb. 10 Titration eines HAA positiven Serums mit Eigenkontrolle

ANSATZSCHEMA FÜR PATIENTEN

Die inaktivierten Patientenserum werden im Screening unverdünnt und in Pufferverdünnungen 1:10 und 1:100 gegen ein Anti-HAA und außerdem gegen Puffer als Eigenkontrolle (EK) angesetzt.

Abb. 11 zeigt das Screening bei zwei Patienten im genannten Ansatz und die gleichzeitige Darstellung einer Prozone bei Patient 2. Unverdünnt (1:1) ergab das Serum einen falsch negativen Befund. Erst bei Verdünnung (1:10) konnte der vorhandene HAA-Befund nachgewiesen werden.

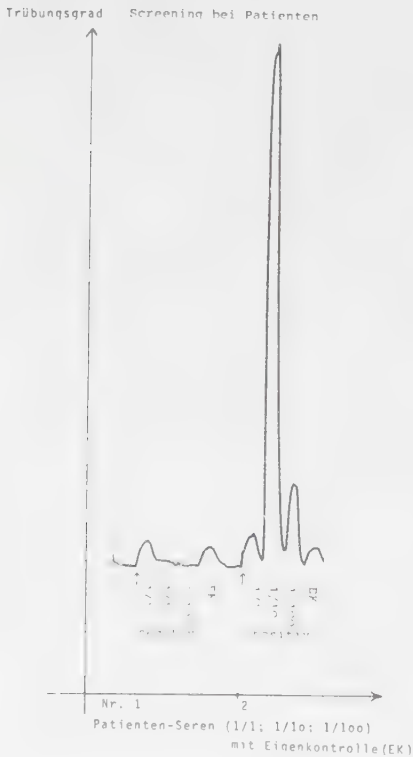


Abb. 11 HAA-Untersuchungen, Screening bei Patienten

Wegen der hohen Frequenz des HA-Antigens, z.B. bei Patienten mit Lebererkrankungen, mit Immundefekten sowie mit verschiedenen genetisch bedingten Erkrankungen sind Serumverdünnungen im Sinne des Poolens wie bei Blutspendern als Screening-Untersuchung nicht geeignet.

Komplementverbrauchende Seren werden austitriert, wie in Abb. 10 bereits dargestellt. Es werden zwei Verdünnungsreihen angesetzt. Die eine Titerreihe wird mit Anti-HAA, die andere zur Feststellung möglicher Eigenhemmung, statt mit Antiserum mit Puffer versetzt.

Phänomen der Eigenhemmung:

Das Phänomen der Serum-Eigenhemmung wird bei Patienten mit Lebererkrankungen häufig nachgewiesen. Bei diesen Seren ergibt sich das Problem einer Abgrenzung von Eigenhemmung allein gegenüber einer Eigenhemmung assoziiert mit HA-Antigen.

Eine Differenzierung zwischen diesen Seren ist nur durch eine weitgehende Austitration möglich. Wir unterscheiden danach:

1. Seren mit Eigenhemmung, die keine oder nur eine Titerstufe Differenz zwischen den beiden Verdünnungsreihen zeigen - HAA negative Seren mit Eigenhemmung - .
2. Seren mit Eigenhemmung, die eine Titerdifferenz von zwei oder mehr Titerstufen zwischen den beiden Verdünnungsreihen aufweisen - HAA positive Seren mit Eigenhemmung - .

Die Abb. 12 zeigt die Austitration von zwei komplementverbrauchenden Patientenseren:

Pat. 1: HAA negatives Serum mit Eigenhemmung

Es besteht keine Titerdifferenz zwischen den beiden Titern.

Pat. 2: HAA positives Serum mit Eigenhemmung

Es besteht eine Titerdifferenz von mehr als zwei Titerstufen zwischen den beiden Titern. Der HAA-Titer ist der Eigenhemmung aufgepfropft.

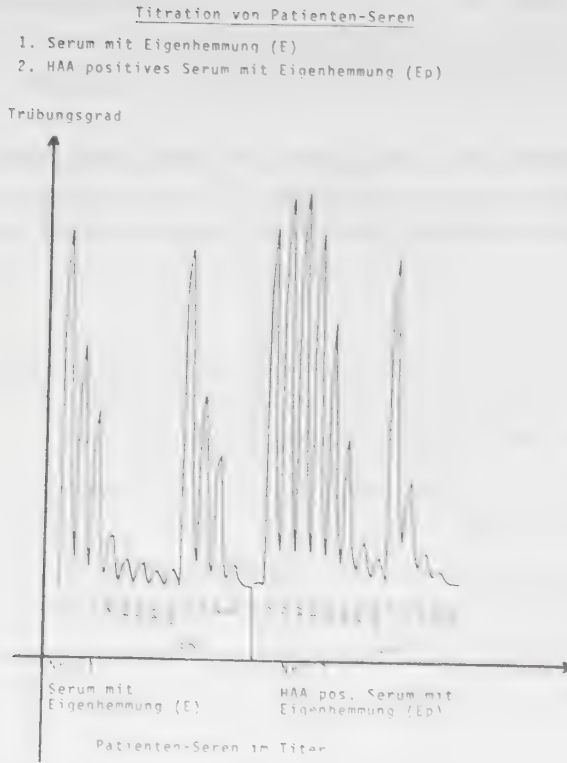


Abb. 12 Titration von Patienten-Seren
Darstellung von Eigenhemmung

Prozonenphänomen:

Seren mit hohen HAA-Titern zeigen häufig mit dem verwendeten Antiserum Prozonen. HAA-positive Seren ergeben dann falsch-negative Befunde. Das Zonenphänomen (Prozone) ist durch einen Antigenüberschuß gegenüber dem Antiserum zu erklären. Es nimmt mit der Verdünnung des Antiserums zu.

Die Prozone wird durch Ausschuß des HAA festgestellt. Bei zunehmender Verdünnung des zu untersuchenden Serums (Antigens), bezogen auf einen bestimmten Titer des Antiserums, möglich.

Die Abb. 13 zeigt die Darstellung des Zonenphänomens in Abhängigkeit von der Verdünnung des Antiserums. Ein HAA positives Serum wurde dreimal austitriert (1:1 bis 1:256) und jeder Titeransatz gegen Anti-HAA unverdünnt und gegen das gleiche Antiserum in verschiedenen Verdünnungen (1:2, 1:4) angesetzt. Mit zunehmender Verdünnung des Antiserums nimmt das Zonenphänomen zu.

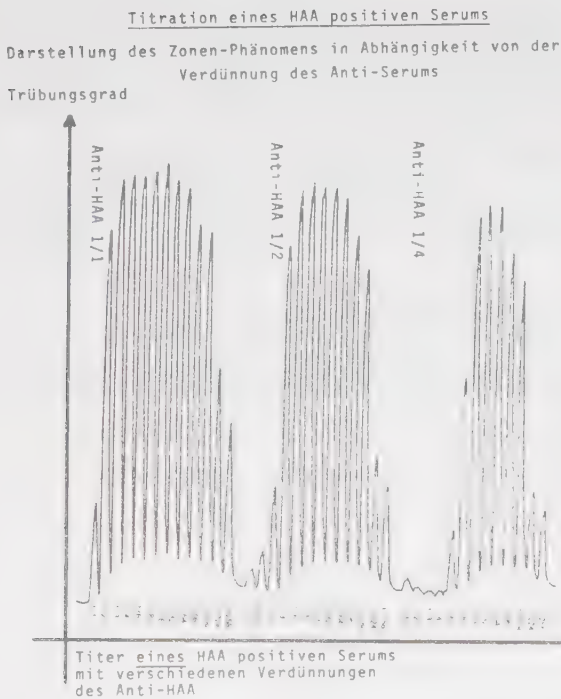


Abb. 13 Darstellung des Zonenphänomens in Abhängigkeit
von der Verdünnung des Anti-Serums

II. ZU DEN GEPOOLTEN SEREN

Die Spenderseren stammen aus dem DRK-Blutspendedienst Rheinland-Pfalz. Sie wurden sowohl mit der Immun-Präzipitations-Elektrophorese (IPE) als auch mit der Komplement-bindungsreaktion (KBR) im AutoAnalyzer im DRK-Blutspendedienst Bad Kreuznach untersucht.

Sie wurden gepoolt und in einem Blindversuch im Einzelansatz unverdünnt und in den Pufferverdünnungen 1:10 nachkontrolliert. Die Befunde stimmten in allen Fällen überein. Sind in einem Pool mehrere HAA positive Seren enthalten, so ist die Screening-Reaktion ebenfalls positiv. Sie ist auch dann positiv, wenn Anti-HAA und HAA in einem Pool enthalten sind.

Außer in der Komplementbindungsreaktion haben wir alle Spenderseren zusätzlich in der Immun-Präzipitations-Elektrophorese (IPE) nach PSENDORFER et al (65) untersucht. Es wurden alle Befunde, die in der IPE erhoben wurden, ebenfalls in der KBR gefunden.

Ein Teil der HAA positiven Befunde wurde zusätzlich im OUCHTERLONY-Test (ID), in der Immun-Präzipitations-Elektrophorese (IPE) und in der Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR) titriert und im Titer verglichen. Der Titervergleich ist in Tabelle 5 und 6 dargestellt.

Die Empfindlichkeit steigt von der ID über die IPE zur KBR.

HAA positive Seren, die sich nur mit der KBR nachweisen ließen, wurden zur Spezifitätskontrolle mit Antiseren der Firmen ABBOTT und IMMUNO nachkontrolliert. Dabei bestätigte sich die Erstbefundung.

HAA-Untersuchungen bei Blutspendern in der KBR im AutoAnalyzer und in der IPE

Anzahl der Blutspender:	45.262
davon waren:	
KBR HAA positiv	94 (0,21 %)
IPE HAA positiv	82 (0,18 %)

Mit der KBR haben wir bei den Blutspendern 15 % mehr HAA positive Fälle als in der IPE nachweisen können.

III. ZU DEN PATIENTEN-SEREN

Die Patientenseren wurden uns freundlicherweise von der II. Med. Klinik der Universitätsklinik Mainz zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um Seren von Patienten mit Lebererkrankungen.

Das Krankengut wurde nach folgenden Diagnosen aufgeschlüsselt:

Zustand nach akuter Hepatitis (AH)

Chronisch persistierende Hepatitis (CPH)

Chronisch aggressive bzw. aktive Hepatitis (CAH)

Posthepatische bzw. kryptogene Zirrhose (CI)

Verschiedenes: Fettleber, biliäre Zirrhose, Lupus erythematoses, Hämochromatose u. a.

Die HAA-Untersuchung erfolgte einmal mit der Immun-Präzipitations-Elektrophorese (IPE) in der II. Med. Klinik der Universitätsklinik Mainz und zum anderen mit der Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR) im AutoAnalyzer im DRK-Blutspendedienst in Bad Kreuznach. Von diesen 404 Patienten wurden im Sinne einer Verlaufskontrolle insgesamt 1.069 Untersuchungen vorgenommen.

Wurde bei einem Patienten einmal oder mehrere Male das HA-Antigen nachgewiesen, so wurde er als HAA positiv bezeichnet.

Das gewonnene Zahlenmaterial der HAA positiven und HAA negativen Befunde wurde einmal auf die Anzahl der Patienten selbst (404) und zum anderen auf die Anzahl der Patienten-Untersuchungen (1.069) bezogen und nachfolgend dargestellt.

HAA-Befunde bei Leber-Patienten in der KBR im AutoAnalyzer und in der IPE

Anzahl der Patienten:	404
KBR HAA positiv	109 (27 %)
HAA negativ	295 (73 %)
IPE HAA positiv	58 (14 %)
HAA negativ	346 (86 %)

Mit der KBR haben wir bei den Patienten 88 % mehr HAA positive Fälle als in der IPE nachweisen können.

Anzahl der <u>Patienten-Untersuchungen:</u>		1.069
KBR	HAA positiv	215 (20 %)
davon:	HAA pos. und E pos.	87 (8 %)
	HAA negativ	854 (80 %)
davon:	HAA neg. und E pos.	206 (19 %)
Gesamt-Eigenhemmung		293 (27 %)
IPE	HAA positiv	135 (13 %)
	HAA negativ	934 (87 %)

Mit der KBR haben wir bei den Patienten-Untersuchungen 59 % mehr HAA positive Fälle als in der IPE nachweisen können.

Das diagnostisch gruppierte Krankengut wurde ebenso für Patienten und Patientenuntersuchungen entsprechend der HAA positiven und HAA negativen Befunde in der KBR und IPE aufgeschlüsselt und auf S. 29 und 30 dargestellt.

Schließlich wurde die Verteilung der Eigenhemmung bei HAA positiven und HAA negativen Befunden, bezogen auf die 1.069 durchgeführten Patienten-Untersuchungen, betrachtet. Darstellung auf S. 30.

DAS KRANKENGUT, AUFGESCHLÜSSELT NACH DIAGNOSE

Patienten - Befunde in der KBR und IPE -

Diagnose	Gesamtzahl	K B R			I P E		
		HAA + Anzahl	HAA + rel. Häufigk.	HAA - Anzahl	HAA + Anzahl	HAA + rel. Häufigk.	HAA - Anzahl
AH	159	32	20	127	16	10	143
CPH	21	6	29	15	5	24	16
CAH	98	47	48	51	27	28	71
CI	56	16	29	40	8	14	48
Versch.	70	8	11	62	2	3	68
Summe	404	109	27	295	58	14	346

PATIENTEN-UNTERSUCHUNGEN, AUFGESCHLÜSSELT NACH DIAGNOSEN

Patienten-Untersuchungen - Befunde in der KBR und IPE -

Diagnose	Gesamt- zahl	KBR						IPE			
		Eigenhemmung									
		HAA +		HAA -		Gesamt		HAA +		HAA -	
		Anzahl	rel.	Anzahl	rel.	Anzahl	rel.	Anzahl	rel.	Anzahl	rel.
		Häufigk.	Häufigk.	Häufigk.	Häufigk.	Häufigk.	Häufigk.	Häufigk.	Häufigk.	Häufigk.	Häufigk.
AH	268	44	16	224	84	47	18	12	4	35	13
CPH	41	12	29	29	71	11	27	3	7	8	20
CAH	438	123	28	315	72	130	30	54	12	76	17
CI	140	27	19	113	81	58	41	14	10	44	31
Versch.	182	9	5	173	95	47	26	4	2	43	24
Summe	1069	215	20	854	80	293	27	87	8	206	19
										135	13
										934	87

Patienten-Untersuchungen (KBR) - Verteilung der Eigenhemmung

Diagnose	Gesamt- zahl	Eigenhemmung +						Eigenhemmung -					
		Gesamt		HAA +		HAA -		Gesamt		HAA +		HAA -	
		Anzahl	rel.	Anzahl	rel.	Anzahl	rel.	Anzahl	rel.	Anzahl	rel.	Anzahl	rel.
		Häufigk.	Häufigk.	Häufigk.	Häufigk.	Häufigk.	Häufigk.	Häufigk.	Häufigk.	Häufigk.	Häufigk.	Häufigk.	Häufigk.
AH	268	47	18	12	26	35	74	221	82	32	14	189	86
CPH	41	11	27	3	27	8	73	30	73	9	30	21	70
CAH	438	130	30	54	42	76	58	308	70	69	22	239	78
CI	140	58	41	14	24	44	76	82	59	13	16	69	84
Versch.	182	47	26	4	9	43	91	135	74	5	4	130	96
Summe	1069	293	27	87	30	206	70	776	73	128	16	648	84

C. DISKUSSION

Die Bestimmung von Australia-Antigen (HAA) ist inzwischen zu einer Routinemethode geworden.

Da als gesichert gilt, daß das HA-Antigen mit der Hepatitis B assoziiert ist (5, 28, 29, 42, 62, 69, 79), gibt der Nachweis des Australia-Antigens derzeit die beste Information über die Verbreitung der Hepatitis B in verschiedenen Populationen.

Die bisher üblichen Verfahren sind:

1. Agargel-Immun-Diffusion (ID) (Ouchterlony-Test)
2. Immun-Präzipitations-Elektrophorese (IPE)
3. Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR)
4. Radio-Immunologischer Nachweis (Radio-Immuno-Assay-Test)
5. Hämagglutination-Inhibitions-Test

Die Entwicklung verfeinerter Verfahren hatte den Sinn, das Kollektiv der HAA positiven Patienten und Seren möglichst weitgehend auszuschöpfen. So konnte die Steigerung der Empfindlichkeit der oben angeführten Methoden 1. bis 5. durch die Literatur (40, 52, 76, 85, 86, 96, 97, 98) bestätigt werden.

Der Radio-Immuno-Assay-Test ist hinsichtlich seiner Wertigkeit noch umstritten, weil offensichtlich, von der Reinheit der Substrate abhängig, mit einer hohen Quote von Unspezifitäten gerechnet werden muß. Aus diesem Grunde stellte sich erneut die Frage nach der Entwicklung einer spezifischen, sensiblen, automatischen Methode zum HAA-Nachweis.

Unter den oben genannten Techniken lassen sich diese Forderungen am besten für die KBR erfüllen.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb eine neue Methode (KBR im AutoAnalyzer) entwickelt und standardisiert, und ihre Anwendbarkeit überprüft:

1. An einem Spendergut wurde die Immun-Präzipitations-Elektrophorese (IPE) mit der Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR) im AutoAnalyzer im Ergebnis verglichen, um eine Aussage über die Empfindlichkeit dieser zwei Techniken bei der Bestimmung des HAA zu erhalten;
2. An einem Krankengut mit einem klinisch, biochemisch, bioptisch und immunologisch definierten Kollektiv mit verschiedenen Lebererkrankungen wurden vergleichende Untersuchungen vorgenommen, um
 - a) Zusatzinformationen dieser Untersuchungstechnik,

- b) die Störanfälligkeit des Systems,
 - c) die Grenzen der Methoden
- zu definieren.

Ein solcher Ansatz ist nur dann möglich, wenn man als Vergleichsbasis eine Untersuchungstechnik (IPE) zum Einsatz bringt, die hinsichtlich der Spezifität als die bisher sicherste Methode überhaupt angesehen werden darf.

1. DISKUSSION ZUR METHODE

Bei der beschriebenen Methode, der KBR im AutoAnalyzer, sind folgende technische Besonderheiten zu beachten:

1. Berücksichtigung eines unspezifischen Komplementverbrauchs:

Die in der KBR verwendeten Antiseren (Tier - Mensch) binden in unterschiedlichem Maße Komplement. Diese antikomplementäre Wirkung muß bei der Festlegung der geeigneten Komplementdosis (kinetische Komplementtitration) berücksichtigt werden.

2. Thermische Amplitude:

Die optimale Komplementbindung erfolgt bei 37°C in einer Zeit von 15 - 20 Min. an einen bereits vorgebildeten Antigen-Antikörper-Komplex. Sie ist verzögert bei Temperaturen von 20°C und 4°C.

3. Interpretation von Verdünnungsreihen:

Nach dem Screening bei Spendern und Patienten werden von allen Seren mit komplementverbrauchenden Reaktionen zwei geometrische Verdünnungsreihen angesetzt. Die eine Titerreihe wird mit dem Antiserum, die andere, zur Feststellung möglicher Eigenhemmung, statt mit Antiserum mit Puffer versetzt.

4. Prozonophänomen:

Seren mit hohem HAA-Titer zeigen häufig mit den verwendeten Antiseren Prozonen, die mit der Verdünnung des Antiserums zunehmen. Der Nachweis oder Ausschluß des HAA ist erst nach entsprechender Verdünnung des HAA-haltigen Serums, bezogen auf einen bestimmten Titer des Anti-Serums, möglich (Abb. 13).

5. Phänomen der Eigenhemmung:

Während bei der Untersuchung der Spenderseren das Phänomen der Eigenhemmung nur ganz selten beobachtet wurde, konnten wir die Eigenhemmung (Komplementverbrauch durch das Serum allein) bei dem Patientenkollektiv mit Lebererkrankungen sehr häufig

und in einem starken Maße nachweisen.

Bei diesen Seren ergab sich das Problem einer Abgrenzung von Eigenhemmung allein gegenüber einer Eigenhemmung assoziiert mit positivem HA-Antigen. Bezogen auf einen bestimmten Titer des Anti-Serums war eine Differenzierung zwischen diesen Seren nur durch eine weitgehende Austitration möglich (Australia-Antigen-Titer ist der Eigenhemmung aufgepfropft) (Abb. 12).

Wir unterscheiden:

- a) HAA positive Seren ohne Eigenhemmung.
- b) HAA positive Seren mit Eigenhemmung (die Titerdifferenz beträgt 2 oder mehr Titerstufen zwischen dem HAA-Titer und dem Titer der Eigenhemmung).
- c) HAA negative Seren ohne Eigenhemmung.
- d) HAA negative Seren mit Eigenhemmung (es besteht bei dieser Gruppe keine oder nur eine Titerstufe Differenz zwischen den beiden Verdünnungsreihen).

6. Grenzen der Methode:

Mit der KBR im AutoAnalyzer lassen sich nur Sera aber keine Plasmen auf HAA untersuchen. Der Nachweis von HAA-Antikörpern im Serum ist nicht möglich. Trübe, stark gefärbte Seren oder Seren mit Eigenhemmung, die keine oder nur geringe Titerdifferenzen zwischen den beiden Verdünnungsreihen zeigen, lassen eine eindeutige Beurteilung in diesem System nicht zu.

II. DISKUSSION ZUR UNTERSUCHUNG AM SPENDERGUT

Die Empfindlichkeit der KBR stimmt mit der Literatur überein (40, 52, 76, 85, 86, 96).

Die Empfindlichkeit des Radio-Immuno-Assay-Testes wird nicht erreicht (96).

Da bei unseren Spendern nur mit einer geringen Anzahl positiver Reaktionen zu rechnen ist, ist es möglich, in jedem Reaktionsansatz mehrere Probandenserum zu poolen. Dieses ist besonders dadurch mit Vorteilen verbunden, weil Prozonephänomene in der Regel durch Verdünnung verringert bzw. aufgehoben werden, auch dann, wenn mehrere Antigene vorhanden sind.

III. DISKUSSION ZUR UNTERSUCHUNG BEI PATIENTEN MIT LEBERERKRANKUNGEN:

Es handelt sich hierbei um Patienten mit Lebererkrankungen, deren Diagnose im Rahmen einer stationären Behandlung gesichert wurde. Die Zuordnung zu den verschiedenen Gruppen erfolgte auf Grund anamnestischer, klinischer, biochemischer, histologischer und immunologischer Untersuchungsbefunde.

Die vergleichenden Untersuchungen in der KBR und in der IPE bestätigten die größere Empfindlichkeit in der KBR gegenüber der IPE (40, 52, 76, 85, 86, 96). Während bei unseren Blutspendern eine ausgeprägte Empfindlichkeitssteigerung der KBR gegenüber der IPE nicht mit Sicherheit gefunden werden konnte (15 % mehr HAA positive Fälle in der KBR als in der IPE), bringt das Ergebnis der Patienten-Untersuchungen (59 % mehr HAA positive Fälle in der KBR als in der IPE) die Steigerung der Empfindlichkeit der KBR gegenüber der IPE deutlich zum Ausdruck.

Die Unterschiede zwischen Blutspendern und Patienten sind wohl am ehesten durch die unterschiedliche Höhe der Antigen-Titer zu erklären. Gesunde Antigenträger und Patienten mit persistierenden Hepatitiden zeigen wesentlich höhere Antigen-Titer (25, 26, 58) und können deshalb zum größten Teil in der IPE nachgewiesen werden. Leberpatienten mit einem massiven Leberzellschaden, insbesondere mit Leberzirrhose, weisen niedrigere Antigen-Titer auf und werden häufig nur in der KBR nachgewiesen (58).

Von 1.069 Untersuchungen waren in der KBR 20 %, in der IPE 13 % positiv. Vergleiche mit Untersuchungen anderer Autoren (24, 36, 58, 70, 78, 82, 85, 96), die Untersuchungen mit der KBR durchgeführt haben, ergaben unterschiedliche Häufigkeiten. Es läßt sich nicht entscheiden, wie weit diese Unterschiede methodisch bedingt sind oder vom Umfang der Patientenkollektive abhängen.

Das Phänomen der Eigenhemmung bietet in der KBR ein besonderes Problem. Eine Aufschlüsselung des Krankengutes nach Eigenhemmung mit oder ohne HAA findet sich in der Literatur nur selten (58, 87).

Immerhin erwies sich die hier eingesetzte automatische KBR im AutoAnalyzer unter Berücksichtigung der eingangs geschilderten methodischen Besonderheiten als geeignet, dieses wichtige Ergebnis zu ermitteln.

Eigenhemmung wurde in einer Frequenz von 27 % nachgewiesen. Bemerkenswert ist, daß von 215 HAA positiven Untersuchungen 87 Fälle (41 %) eine Eigenhemmung bei gleichzeitigem Nachweis von HA-Antigen zeigten.

Berücksichtigt man, daß 19 % aller untersuchten Seren HAA negativ bei gleichzeitiger Eigenhemmung waren, so kann sich hinter diesem Phänomen der Eigenhemmung bei nicht sachgemäßer Durchführung serologischer Methoden zum Nachweis von HAA eine relativ hohe Dunkelziffer verbergen.

Während bei gesunden Spendern das Problem der Eigenhemmung grundsätzlich nur selten eine Rolle spielt, zeigen Seren von Patienten, insbesondere mit chronischen Lebererkrankungen,

kungen, eine relativ hohe Frequenz von Eigenhemmung in frisch untersuchten bzw. vorher bei -70°C aufbewahrten Seren.

Im eigenen Krankengut lag die Frequenz der Eigenhemmung bei 27 %. Bedeutsamer ist allerdings, daß 87 von 215 Sera (41 %) eine Eigenhemmung und gleichzeitig einen HAA positiven Befund zeigten.

Die IPE erlaubt hier keine Differenzierung und zusätzliche Ausschöpfung positiver Befunde.

Das Phänomen der Eigenhemmung bei Lebererkrankungen ist in sich hinsichtlich der Ätiologie schwer interpretierbar. Am wahrscheinlichsten sind zirkulierende Immunkomplexe (82) bzw. aggregierte Gammaglobuline hierfür verantwortlich zu machen.

Da aggregierte Gammaglobuline häufig mit einem veränderten Albumin-Globulin-Quotienten zuungunsten von Albumin verbunden sind, sind diese Befunde am häufigsten bei Leberzirrhose zu erwarten (87), wie es die eigenen Untersuchungen bestätigen.

Bemerkenswert ist allerdings, daß auch 18 % der Patienten mit Zustand nach akuter Hepatitis und 27 % der Patienten mit chronisch persistierenden Hepatitiden dieses Phänomen zeigten, obgleich keine Hypergammaglobulinämie vorlag. Bei diesen Erkrankungen sind somit zirkulierende Immunkomplexe zu erwarten bzw. anzunehmen, an denen unter Berücksichtigung der eigenen Ergebnisse, HA-Antigen beteiligt sein dürfte.

Schlüsselt man die Fälle mit Eigenhemmung nach HAA positiv und HAA negativ auf, so ergibt sich die höchste Frequenz von Immun-Komplexen, bei denen HA-Antigen beteiligt sein könnte, in der Gruppe CAH mit 42 %.

In dieser Gruppe ergibt sich die interessante Feststellung, daß immerhin 69 (56 %) Patienten-Untersuchungen von 123 HAA positiven Fällen keine Eigenhemmung zeigten. Es stellt sich die Frage, ob es sich hier um persistierende Antigenträger handelt. 76 von 130 CAH Patienten-Untersuchungen (58 %) mit Eigenhemmung haben entweder aggregierte Gammaglobuline oder Immun-Komplexe anderer Genese in ihrem Serum.

Grundsätzlich ist diese Tendenz in allen Gruppen festzustellen (bei Zustand nach Hepatitis (AH) und bei posthepatischer bzw. kryptogener Zirrhose (Cl)). Das Kollektiv der chronisch persistierenden Hepatitis (CPH) ist für diese Differenzierung zu klein.

Betrachtet man die KBR unter diesem Gesichtspunkt, so kann im Hinblick auf pathogenetische Reaktionen durch diese Untersuchung ein wichtiger Beitrag zur Frage einer direkten, indirekten oder passiven humoralen Zytotoxizität erarbeitet werden. Die unklare Rolle des HA-Antigens im Rahmen der Pathogenese chronisch fortschreitender Lebererkrankungen fordert zu dieser weitergehenden Differenzierung und Bestimmung der Reaktionen dieser Patienten auf.

Es wird notwendig sein, die hier vorgelegten Befunde mit dem Verlauf der Erkrankung sowie einiger klinischer, biochemischer, morphologischer und immunologischer Besonderheiten zu vergleichen, um für weitergehende prospektive Studien die Voraussetzung zu schaffen.

Faßt man somit die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit zusammen, so stellt die Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR) im AutoAnalyzer eine wesentliche Bereicherung des methodischen Spektrums zur Erfassung des HA-Antigens dar. Die Methode erbringt reproduzierbare Ergebnisse bei Seren gesunder Blutspender und von Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen.

Bei Leberpatienten liefert diese Methode mit der Differenzierung der antikomplementären Eigenschaften wichtige Zusatz-Informationen.

Die Häufigkeit dieser Untersuchungen unterstreicht den Wert einer automatischen Analyse auch für die klinische Routine-Diagnostik.

Sie dürfte in der dargestellten Form der mit der Hand durchgeführten KBR überlegen sein, da die genaue Einstellung des Komplements (kinetische Komplement-Titration) und die Konstanzhaltung der Temperatur möglich sind, und darüber hinaus der Reaktionsablauf photometrisch gemessen und graphisch festgehalten werden kann.

Die Standardisierung als AutoAnalyzer-Technik ist einfach durchführbar.

Ein Vergleich mit empfindlicheren Techniken wird notwendig sein, um dieser Methode vor einer generellen Empfehlung als Routine-Methode den richtigen Stellenwert zu geben.

Tab. 11. 1. Häufigkeit des Australia-Antigens bei verschiedenen Erkrankungen
Ausgangsweise nach BLUMBERG, SUTNICK und LONDON (12) und BLUMBERG, GERSTLEY,
HUNGERFORD, LONDON und SUTNICK (9)).

Immunodiffusionstest

Erkrankung	Anzahl der Fälle	Frequenz
Akute myel. Leukämie	133	11 8,3 %
Chronische myel. Leukämie	186	5 2,7 %
Chronische lymphat. Leukämie	225	22 9,8 %
Chronische lymphat. Leukämie	105	7 6,7 %
Morb. Hodgkin	16	2 13,0 %
Down-Syndrom (hospit.)	257	75 29,0 %
Gliose Tumoren	95	0
Interstitielle Mastozytose	67	0
Lepromatöse Lepra	584	55 9,4 %
Hämophilie	60	3 5,0 %
Autohämolyse	95	1 1,1 %
Thalassämie	84	2 2,4 %
Cholestas	303	0
Karzinome	95	0
Leukämie	15	0

Tabelle 2: Ergebnisse des Australia-Antigens bei verschiedenen Erkrankungen (auszugsweise) (9, 12)

Autor	Erkrankung	Anzahl der Fälle	Frequenz	Technik
Gocke und Kavey	Infekt. Mononukleose	12	0	Immunodiffusion
	Hämophilie	7	2	
	Sichelzellanämie	6	0	
	Thalassämie	8	0	
	Hämolyt. Anämie	7	0	
	Multiple Myelome	10	0	
	Chron. lymphat. Leukämie	4	0	
	Chron. myeloische Leukämie	1	0	
	Hodgkin'sche Erkrankung	9	0	
	Akute Leukämien	6	0	
	Kardiovaskuläre Erkrankung	30	0	
	Infektionskrankheiten	10	0	
	Karzinome	3	0	
Okochi und Murakami	Leukämien	32	3, 2, 4 %	Immunodiffusion
	Hypoplast. Anämien	12	0	
	Rheumatische Erkrankung	24	0	
	Chronische Nephritis	28	2, 7, 1 %	
	Gallenwegkrankungen	45	0	
Krassnitzky und Mitarb.				Immunodiffusion Überwanderungs- elektrophorese
Sanwald und Mitarb.	Pat. mit Dauerdialyse- programm	64	9	Immunodiffusion
	Chron. myeloische Leukämie	13	0	Immunodiffusion
	Chron. lymphat. Leukämie	28	0	
	Unreife Leukosen	21	0	
	Morb. Langdon-Down	27	3	

Tabelle 3: Antigenfrequenz in verschiedenen Populationen
Ausgangsweise nach BLUMBERG, SUTNICK und LONDON (12)

(Immunodiffusionstest)

Population	Anzahl der Fälle	Frequenz
Esquimos (Alaska)	394	1
Indianer (Alaska)	204	0
Indianer (Peru, Coshinahua)	89	18
Indianer (Yukatan)	1417	4
Indianer (Peru, Quechua)	102	0
Neger (Georgia)	607	0
Weißer (Georgia)	896	0
Pare (Tansania)	120	1
Ghanesen	95	9
Japaner	1034	5
Chinesen (USA, Taiwan)	100	0
Taiwanesen	23	3
Vietnamesen	128	8
Finnen	924	1
Lappen und Finnen	127	0
Italiener	212	0
Griechen	857	15
Portugiesen (Hawaii)	44	1
Australier	1807	388
Mikronesier	474	34
		0,3 %
		20,2 %
		0,07 %
		0,8 %
		9,5 %
		0,5 %
		13,0 %
		6,3 %
		0,1 %
		1,8 %
		2,2 %
		2,1 %
		7,2 %

Tabelle 4 Antigenfrequenz bei Blutspendern und hospitalisierten Patienten ohne Lebererkrankungen, Bluterkrankungen und Dialysen (auszugsweise) (12)

Autor	untersuchter Personenkreis	Anzahl der Probanden	Frequenz	Technik
Prince (USA)	Blutspender	4.844	8	Immunodiffusion
Prince u. a. (USA)	Blutspender (Freiwillige)	55.956	58	Immunodiffusion
Smith und Blumberg (USA)	Bevölkerung: Hongkong Ostafrika USA	50 512 2.412	2 8 2	Immunodiffusion Immunodiffusion Immunodiffusion
Gocke und Kavey (USA)	Blutspender	1.726	8	Immunodiffusion
Okada und Moriuchi (Japan)	Blutspender	5.721	68	Immunodiffusion
Lous u. a. (Dänemark)	Hosp. Patienten Schwangere Blutspender	10.000 20.500 6.000	35 34 18	Immunodiffusion Immunodiffusion Immunodiffusion
Guardia u. a. (Spanien)	Blutspender (bezahlt) Blutspender (unbezahlt) Hosp. Patienten	800 250 900	8 1 3	nicht angegeben nicht angegeben nicht angegeben
Bals u. a. (Rumänien)	Gesunde Rumänen	90	0	Immunodiffusion
Krassnitsky u. a. (Österreich)	Hosp. Patienten	1.840		Immunodiffusion, Überwanderungs- elektrophorese
Sanwald u. a. (BRD)	Hosp. Patienten Angehörige d. Dialysepersonals	55 38	1	Immunodiffusion
Sanwald und Sauerbruch (BRD)	Blutspender	2.053	17	Immunodiffusion

Tabelle 4 (Forts.)

Autoren	untersuchter Personenkreis	Anzahl der Probanden	Frequenz	Technik
Parson und BRD	Blutsperder	5.150 742	24 4	0,46 % 0,54 %
Krech u. a. (Schweiz)	Blutsperder Neugeborene	2.541 169	5 10	0,20 % 6,00 %
Shulman und Barker (USA)	Krankenhausangestellte	242	0	KBR, Immunodiffusion
Geserick u. a. (DDR)	Blutsperder Paternitätsprobanden Neugeborene Kreißende	246 155 118 118	5 1 0 3	2,00 % 0,70 % 2,60 % 0,88 %
Velasko und Hartmann	Bevölkerung	679	6	Immunodiffusion
Soulier u. a. Frankreich	Blutsperdepersonal Hospitalpersonal Blutsperder	141 144 2.721	2 4 16	1,40 % 2,80 % 0,60 %
Levene und Blumberg (USA)	Blutsperder	293 Au(1) 293 Au(2)	0 21	Immunodiffusion Immunodiffusion

Tabelle 5: Korrelation des IPE-Titers mit dem ID-Titer bei HAA

Titer	IPE										
	ID	Summe	0	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
1:32		5						1		3	1
1:16		19					3	8	5	3	
1:8		21				2	6	7	3	3	
1:4		53		1	1	7	12	20	9	3	
1:2		41		4	6	13	15	3			
1:1		40		4	12	9	10	4	1		
0		10		2	2	3	3				
Summe		189		11	21	34	49	43	18	12	1

Tabelle 6: Korrelation des IPE-Titers mit dem KBR-Titer bei HAA

Titer	IPE										
	KBR	Summe	0	1: 1	1: 2	1: 4	1: 8	1: 16	1: 32	1: 64	1: 128
≥ 1: 256	57	2	2	4	2	5	15	20	4	5	
1: 128	33	3	3	2	3	5	11	7	2		
1: 64	22	1	1	2	1	7	5	4	1		1
1: 32	31	5	5	4	7	7	7			1	
1: 16	16	6	6		5	2	3				
1: 8	15	9	9	1	1	1			3		
1: 4	9	7	7	1		1					
1: 2	4	4	4								
1: 1											
0											
Summe:	187	37	37	14	19	28	41	31	10	6	1

D. LITERATURVERZEICHNIS

1. AGARWAL, S.S.,
B.S. BLUMBERG, B.J.S. GERSTLEY, I. MILLMAN,
W.T. LONDON, I. SUTNICK, L.A. LOEB
Lymphocyte Transformation and Hepatitis.
I. Impairment of Thymidine Incorporation and
DNA Polymerase Activity.
Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.) 137 (1971), 1498
2. ALMEIDA, J.,
A.P. WATERSON
Immune Complexes in Hepatitis.
Lancet I (1969), 983
3. ALMEIDA, June, D.,
A.J. ZUCKERMANN,
Patricia, E. TAYLOR,
A.P. WATERSON
Immune Electron Microscopy of the Australia-SH
(Serum Hepatitis)-Antigen.
Microbios 2 (1969), 117
4. BANCROFT, W.H.,
F.K. MUNDON and
P.K. RUSSELL
Detection of Additional Antigenic Determinants
of Hepatitis B Antigen.
The Journal of Immunology 109 (1972), 842
5. BAYER, M.E.,
B.S. BLUMBERG, B. WERNER
Particles Associated with Australia Antigen in
the Sera of Patients with Leukaemia, Down's
Syndrome and Hepatitis.
Nature (Lond.) 218 (1968), 1057
6. BECKER, W.,
L. BONACKER, H.G. SCHWICK
Ein einfacher immunologischer Schnelltest zum
Nachweis des Au/SH-Antigens.
Klin.Wschr. 48 (1970), 887
7. BERG, P.A.
Hepatitis-assoziiertes Antigen(HAA): Klinische
und immunologische Bedeutung.
Klin.Wschr. 50 (1972), 125
8. BLUMBERG, B.S.,
J.S. FRIEDLÄNDER,
A. WOODSIDE, A.J. SUTNICK
and W.T. LONDON
Hepatitis and Australia Autosomal Recessive
Inheritance of Susceptibility to Infection in
Humans.
Proc.nat.Acad.Sci.(Wash.) 62 (1969), 1108
9. BLUMBERG, B.S.,
B.J. GERSTLEY, D.A. HUNGER-
FORD, W.T. LONDON,
A.I. SUTNICK
Serum Antigen (Australia Antigen) in Down's
Syndrome, Leukaemia and Hepatitis.
Ann.intern.Med. 66 (1967), 924
10. BLUMBERG, B.S.,
M.D. HARVEY, H.J. ALTER,
S. VISNICH
A "New" Antigen in Leukaemia Sera.
J.Amer.med.Ass. 191 (1965), 541
11. BLUMBERG, B.S.,
N.M. RIDDELL
Inherited Antigenic Differences in Human Serum
Beta Lipoproteins. A Second Antiserum.
J.clin.Invest. 42 (1963), 867
12. BLUMBERG, B.S.,
A.J. SUTNICK, W.T. LONDON
Hepatitis and Leukaemia: Their Relations to
Australia Antigen.
Bull.N.Y. Acad.Med. 44 (1968), 1566
13. BLUMBERG, B.S.,
A.J. SUTNICK, W.T. LONDON
Australia Antigen as a Hepatitis Virus. Variation
in Host Response.
Amer.J.Med. 48 (1970), 1

14. BLUMBERG, B.S.,
A.J. SUTNICK, W.T. LONDON,
I. MILLMAN Current Concepts: Australia Antigen and Hepa-
titis.
New Engl. J. Med. 283 (1970), 349
15. LE BOUVIER, G.L. The Heterogeneity of Australia Antigen.
J. Infect. Dis. 123 (1971), 671
16. LE BOUVIER, G.L.,
R.W. McCOLLUM Australia (Hepatitis-Associated) Antigen:
Physiochemical and Immunological Charac-
teristics.
Advanc. Virus Res. 16 (1970), 357
17. BULKLEY, B.H.,
W.D. HEIZER,
S.E. GOLDFINGER,
K.J. ISSELBACHER Distinctions in Chronic Active Hepatitis Based
on Circulating Hepatitis-Associated Antigen.
Lancet II (1970), 1323
18. BUSCH, H. Hepatitis nach Blutübertragungen.
DMW 96 (1971), 1851
19. CACCIAPUOTI, B. Multichannel System for the Reaction of Prolon-
ged Complement Fixation.
Thurman Associates, Miami, Florida (1971), 1-5
20. COSSART, Y.E.,
J. VAHRMANN Studies of Australia SH-Antigen in Sporadic
Viral Hepatitis in London.
Brit. med. J. 1 (1970), 403
21. COYNE (ZAVATONE), V.E.,
I. MILLMAN, J. GERDA,
B.J.S. GERSTLEY, T. LONDON,
A. SUTNICK, B.S. BLUMBERG The Localization of Australia Antigen by Immun-
fluorescence.
J. exp. Med. 131 (1970), 307
22. CULLIFORD, B.J. Precipitin Reactions in Forensic Problems. A New
Method for Precipitin Reactions on Forensic Blood,
Semen and Saliva Stain.
Nature (Lond.) 201 (1964), 1092
23. DALLAPICCOLA, B. Australia Antigen and Down's Syndrome.
The Lancet (1971), 548
24. DARDANONI, L.,
L. PAGLIARO and C. SPANO Complement Fixation Test in the Study of Australia
Antigen.
Archiv für die gesamte Virusforschung 34 (1971),
51 (Springer-Verlag)
25. DUDLEY, F.J.,
R.A. FOX, S. SHERLOCK The Relationship of Australia Antigen and Comple-
ment to Liver Injury.
6th Meeting of the European Association for the
Study of the Liver, London 1971
26. DUDLEY, F.J.,
R.A. FOX, S. SHERLOCK Relationship of Hepatitis-Associated Antigen (HAA)
to Acute and Chronic Liver Injury.
The Lancet II (1971) 1
27. DUDLEY, F.J.,
R.A. FOX, S. SHERLOCK Cellular Immunity and Liver Disease Duerto.
Lancet I (1972)

28. GESERICH, G. und
G. MÜLLER
Das Australia (SH)-Antigen, ein menschliches
Serumantigen mit Beziehungen zur Virushepatitis.
Zbl. Pharm. 110 (1971), 337
29. GILES, J. P.,
R. W. McCOLLUM,
L. W. BERNDTSON Jr.,
S. KRUGMANN
Viral Hepatitis. Relation of Australia/SH-Antigen
to the Willowbrook MS-2 Strain.
New Engl. J. Med. 281 (1969), 119
30. GITNICK, G. L.,
G. J. GLEICH, L. J. SCHOEN-
FIELD, A. H. BAGGENSTOSS,
A. J. SUTNICK, B. S. BLUMBERG,
W. T. LONDON, W. H. J. SUM-
MERSKILL
Australia Antigen in Chronic Liver Disease with
Cirrhosis.
Lancet II (1969), 285
31. GÖCKE, D. J.,
H. B. GREENBERG, N. B. KAVEY
Hepatitis Antigen: Detection of Infectious
Blood Donors.
Lancet II (1969), 248
32. GÖCKE, D. J.,
H. B. GREENBERG and
N. B. KAVEY
Correlation of Australia Antigen with Post-Trans-
fusion Hepatitis.
J. Amer. Med. Ass. 212 (1970), 877
33. GÖCKE, D. J.,
C. HOWE
Rapid Detection of Australia Antigen by Counter-
immunelectrophoresis.
J. Immunol 104 (1970), 1031
34. GÖCKE, D. J.,
N. B. KAVEY
Hepatitis Antigen. Correlation with Disease and
Infectivity of Blood-Donors.
Lancet I (1969), 1055
35. GREENBERG, H. B.,
D. J. GÖCKE
An Analysis of Antibody Response to Australia
Antigen in Man.
J. infectl. Dis. 123 (1971), 356
36. GUST, I. D. and
J. KALDOR
An Evaluation of the Techniques Used for the
Detection of Australia Antigen and Antibody.
Pathology 3 (1971), 151
37. HALL, Linda, S. and
K. W. WALLS
Stability of Complement as Used in Routine
Diagnostic Tests on the AutoAnalyzer.
Advances in automated analysis 1 (1970), 355.
Technicon internat. Congress Clinical Analysis
38. HIRSCHMANN, R. J.,
N. R. SHULMAN, I. F. BARKER
Viruslike Particles in Sera of Patients with In-
fectious and Serum Hepatitis
J. Amer. med. Ass. 208 (1969), 1667
39. HOLLAND, P. V.,
J. H. WALSH, A. G. MORROW,
R. H. PURCEL
Failure of Australia Antibody to Prevent Post-
transfusion Hepatitis.
Lancet II (1969), 553
40. HOLPER, J. C. and
A. JAMBAZIAN
Comparative Sensitivity of Complement Fixation,
Counterimmuno-electrophoresis, Radial, and
Double Diffusion for Detection of Australia Anti-
gen.
Transfusion 11 (1971), 157

41. KABAT, E.A.,
M.M. MAYER
Experimental Immunochemistry "Komplement"
Kabat and Mayer's Experimental Immunochemistry, 133, Charles C. Thomas, Publ. Springfield, Illinois, 1961
42. KABOTH, U.,
A. SCHÖBER, H.J. ARNDT,
I. VIDO, H. SELMAIR,
E. GALLASCH, P. VERMA,
R. THOMSEN und
W. CREUTZFELDT
Australia (SH)-Antigen-Befunde bei Leberkranken
und Blutspendern.
Dtsch.Med.Wschr. 95 (1970) 2157
43. KABOTH, U.,
A. SCHÖBER, O. KLINGE,
H.D. LOWITZ, E. QUELLHORST,
F. SCHELER, W. CREUTZFELDT
Endemie Australia (SH)-Antigen-positiver Hepatiden in einem Dialysezentrum
Dtsch.Med.Wschr. 96 (1971), 1235
44. KELEN, A.E.,
A.E. HATZAWAY and
D.A. McLEOD
Rapid Detection of Australia/SH Antigen and Antibody by a Simple and Sensitive Technique of Immunoelectronmicroscopy.
Canadian J. of Microbiol. 17 (1971), 993
45. KOSZINOWSKI, U.,
R. THOMSEN und A. SCHÖBER
In-vitro-Stimulation der Lymphozyten von HB-Antikörper-Trägern durch HB-Antigen (Australia-Antigen).
Dtsch.med.Wschr. 98 (1973), 262
46. KRASSNITZKY, O.,
F. PESENDORFER und F. WEWALKA
Australia/SH-Antigen und Lebererkrankungen.
Dtsch.med.Wschr. 95 (1970), 249
47. KRUGMAN, S.,
J.P. GILES
Viral Hepatitis. New Light on an Old Disease.
J.Amer.med.Ass. 212 (1970), 1019
48. LAIWAH, A.A.C.Y.
Lymphocyte Transformation by Australia Antigen.
Lancet Aug. (1971), 470
49. LARSON, Ch.,
St. J. DOWDEN and
Joan M. GORMAN
The Development of a Completely Automated Micro-Volume Complement Fixation Procedure.
Advances in Automated Analysis I (1970) 347.
Technicon internat. Congr. Clinical Analysis.
50. LEVENE, C.,
B.S. BLUMBERG
Additional Specificities of Australia Antigen and the Possible Identification of Hepatitis Carriers.
Nature 221 (1969), 195
51. MAGNIUS, L.O. and
J.A. ESPMARK
New Specificities in Australia Antigen Positive Sera Distinct from the Le Bouvier Determinants.
J.Immunol. 109 (1972), 1017
52. MAYUMI, M.,
K. OKOCHI und K. NISHIOKA
Detection of Australia Antigen by Means of Immune Adherence Haemagglutination Test.
Vox Sang. 20 (1971), 178
53. MELARTIN, L. and
B.S. BLUMBERG
Production of Antibody against "Australia Antigen" in Rabbits.
Nature 210 (1966), 1340

54. MILLMAN, I.,
S.J. AGARWAL, BUGBEE,
B.S. BLUMBERG, L.A. LOEB
Lymphocyte Transformation and Hepatitis.
II. Lack of Direct in Vitro Inhibition by Purified
Australia Antigen.
Proc.Soc.Exp.Biol.(N.Y.) 138 (1971), 198
55. MILLMAN, I.,
W.T. LONDON, A.I. SUTNICK,
B.S. BLUMBERG
Australia Antigen-Antibody Complexes.
Nature 226 (1970), 83
56. MILLMAN, I.,
V. ZAVATONE, B.J.S. GERSTLEY,
B.S. BLUMBERG
Australia Antigen Detected in the Nuclei of
Liver Cells of Patients with Viral Hepatitis by
the Fluorescent Antibody Technique.
Nature (Lond.) 222 (1969), 181
57. MILLMAN, I.,
J.F. ZIEGENFUSS, Jr.,
V. RAUNIO
The Production of Antibodies to Australia Antigen
in Mouse Ascites Fluid.
Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.) 133 (1970), 1426
58. MÜLLER, R.,
J.R. KALDEN, B. BARUTH und
H. DEICHER
Australia-Antigen bei chronisch-aggressiver
Hepatitis und Leberzirrhose.
Dtsch.med.Wschr. 97 (1972), 369
59. MÜLLER, R.,
H.W. KRETH und H. DEICHER
Die Bedeutung der Antigenämie für den Verlauf
der Australia-Antigen-positiven Hepatitis.
Dtsch.med.Wschr. 96 (1971), 1268
60. MÜLLER, R.,
J. MAESS und H. DEICHER
Fluoreszenzserologischer Nachweis von Australia-
Antigen in der Leber.
Dtsch.med.Wschr. 98 (1973), 93
61. NOWOSLAWSKI, A.,
W.J. BRZOSKO,
K. MADALINSKI,
K. KRAWCZINSKI
Cellular Localisation of Australia Antigen in the
Liver of Patients Lymphoproliferative Disorders.
Lancet I (1970), 494
62. OKOCHI, K.,
S. MURAKAMI
Observations on Australia Antigen in Japanese.
Vox Sang. 15 (1968), 374
63. OKOCHI, K.,
S. MURAKAMI, K. NINOMIYA
and M. KANEKO
Australia Antigen, Transfusion and Hepatitis.
Vox Sang. 18 (1970), 289
64. PESENDORFER, F. und
O. KRASSNITZKY
Neue Gesichtspunkte bei der Verhütung der
transfusionsbedingten Serumhepatitis (Au/SH-
Antigen).
Wiener Klin.Wschr. 83 (1971), 576
65. PESENDORFER, F.,
O. KRASSNITZKY und
F. WEWALKA
Immunelektrophoretischer Nachweis von "Hepa-
titis-Associated-Antigen" (Au/SH-Antigen).
Klin.Wschr. 48 (1970), 58
66. PRINCE, A.M.
An Antigen Detected in the Blood during Incu-
bation Period of Serum Hepatitis.
Proc.nat.Acad.Sci. 60 (1968), 814
67. PRINCE, A.M.
Relation of Australia and SH/Antigens.
Lancet II (1968), 462

68. PRINCE, A.M.,
K. BURKE
Serum Hepatitis Antigen (SH): Rapid Detection by High Voltage Immunoelectrophoresis. *Science* 169 (1970), 593
69. PRINCE, A.M.,
R.L. HARGROVE, W.SZMUNESS,
C.E. CHERUBIN, V.J. FONTANA,
G.H. JEFFRIES
Immunologic Distinction between Infectious and Serum Hepatitis. *New Engl.J.Med.* 281 (1970), 987
70. PURCELL, R.H.,
P.V. HOLLAND, J.H. WALSH,
D.C. WONG, A.G. MORROW
and R.M. CHANOCK
A Complement-Fixation Test for Measuring Australia Antigen and Antibody. *J.Infec.Dis.* 120 (1969), 383
71. RAUNIO, V.K.,
W.T. LONDON, A.I. SUTNICK,
B.S. BLUMBERG
Specificities of Human Antibodies to Australia Antigen. *Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.)* 134 (1970), 548
72. REED, Donna, J.,
B.A. Marie KENNEDY,
Wally LAPSA
Automated Complement Fixation Testing - Further Advances. *Advances in Automated Analysis 1* (1970), 359. *Technicon Internat. Congr. Clinical Analysis*
73. SANWALD, R.,
E. RITZ, W. RAPP, K. ANDRASSY,
B. KOMERELL
SH-Antigen bei Dauerdialyse-Patienten. *Dtsch.med.Wschr.* 95 (1970), 253
74. SANWALD, R.,
T. SAUERBRUCH
Australia (SH)-Antigen bei Blutspendern und Empfängern. *Dtsch.med.Wschr.* 95 (1970), 2153
75. SAVARIS, C.A.,
L. BONACKER
Membrane-Complement Fixation Test for Hepatitis Associated Antigen. *Nature (Lond.)* 228 (1970), 61
76. SCHMIDT, N.J.,
P.S. GEE and E.H. LENNETTE
Relative Sensitivity of Gel Diffusion, Complement Fixation, and Immunoelectrophoresis Tests for Detection of Hepatitis-Associated Antigen and Antibody. *Appl.Microb.* 22 (1971), 165
77. SCHNEIDER, W.,
Ch. FRÖHLICH
Australia-Antigen (HAA) und Transfusionshepatitis. *Diagnostik* 5 (1972), 213
78. SCHOBER, A.,
U. KABOTH, R. THOMSEN
Probleme der Standardisierung der Australia (SH)/Antigen-Bestimmung. *Deutsch.med.Wschr.* 96 (1971), 1628
79. SCHOBER, A.,
R. THOMSEN, U. KABOTH
Serologische Subtypen des Hepatitis-B-Antigens (Australia-Antigen). Hepatitis-B-Epidemie des Subtyps "Y" bei regional vorherrschendem Subtyp "D". *Dtsch.med.Wschr.* 97 (1972), 1579
80. SELMAIR, H.,
I. VIDO, U. KABOTH,
A. SCHOBER
Australia (SH)-Antigen-Befunde bei floriden und ausgeheilten chronisch-persistierenden Hepatitiden. *Dtsch.med.Wschr.* 96 (1971), 1908

81. SHULMAN, N.R. Hepatitis-Associated Antigen
Amer. J. Med. 49 (1970), 669
82. SHULMAN, N.R.,
L.F. BARKER Virus-Like Antigen, Antibody, and Antigen-
Antibody Complexes in Hepatitis Measured by
Complement Fixation.
Science 165 (1969), 304
83. SHULMAN, N.R.,
R.J. HIRSCHMANN,
L.F. BARKER Viral Hepatitis.
Ann.intern.Med. 72 (1970), 257
84. STEFFEN, K. Allgemeine und experimentelle Immunologie und
Immunpathologie sowie ihre klinische Anwendung.
Komplement-Titration/Komplement-Bindungsreak-
tion.
Georg Thieme Verlag, Stuttg. 1968, 611
85. STURGEON, P.,
K.S. KWAK, G. GITNICK Australia Antigen Detection by a Rapid Automa-
ted Complement Fixation Method.
Vox Sang. 20 (1971), 533
86. SUBA, E. Comparison of Automated Complement Fixation
and Immunodiffusion Methods for the Detection
of Australia Antigen.
Advances in Automated Analysis I (1970), 337.
Technicon Internat. Congr. Clinical Analysis
87. THIRY, Lise,
G. CLINET, M. CREMER,
E. YOURASSOWSKY,
C. TOUSSAINT, A. DACHY,
A. GOVAERTS High Anticomplementary Activity in Au-Antigen-
Positive Cirrhosis.
Lancet Sept. (1971), 547
88. TILLES, J.G.,
C.Y. KIM Immunologic and Electrophoretic Heterogeneity
of Hepatitis Associated Antigen.
J.infect.Dis. 123 (1971), 618
89. TURNER, G.C.,
G.B. WHITE SH-Antigen in Haemodialysis-Associated Hepa-
titis.
Lancet II (1969), 121
90. VARGUES, R.,
R. AYEVA Courbes Cinétiques Automatiques (Auto-Analyseur
Technicon) de la Fixation du Complement sur
Divers Complexes "Antigenes-Anticorps"
C.R.Soc.Biol. 158 (1964), 1401
91. VARGUES, R. Recherches sur la Cinétique des Reactions de
Fixation du Complement.
Ann.Inst.Pasteur 108 (1965) 196
92. VARGUES, R. Principles and Technique of a Simple Method to
Automate the Complement Fixation Reactions.
Proc.11th Congr.int.Soc.Blood Transf. Sydney
1966; Bibl.haemat. Nr. 29, Part 3, 958-967
(Karger, Basel/New York 1968)

93. VARGUES, R. Automation of Complement Fixation Reactions: Application to The Wassermann Test. Advances in Automated Analysis, Technicon Internat. Congr. I (1970), 507, Clinical Analysis
94. VARGUES, R.,
F. GONTHIER Obtention Automatique des Courbes de Titrage du Complement. Etude Critique de L'equation de von Krogh. Ann. Inst. Pasteur 108 (1965), 526
95. VARGUES, R.,
H. VARGUES, S. VERNACE Kinetics of Complement Fixation in the Determination of Australia Antigen. Advances in Automated Analysis 1 (1970), 331, Technicon Internat. Congr. Clinical Analysis
96. VERNACE, S.,
R. VARGUES, F. PARONETTO,
F. SCHAFFNER Clinical Experience with an Automated Complement Fixation Method for the Detection of Australia Antigen. Thurman Assoc., Miami, Florida (1971), 1-3
97. VYAS, G.N.,
N.R. SHULMAN Hemagglutination Assay for Antigen and Antibody Associated with Viral Hepatitis. Science 170, (1970), 332
98. WALSH, J.H.,
R. YALO, S.A. BERSON Detection of Australia Antigen and Antibody by Means of Radioimmunoassay Techniques. J. infect. Dis. 121 (1970), 550
99. WHITE, G.B.,
R.M. LASHEEN, G.C. TURNER Rapid Detection of Australia Antigen by Cross-Over Electrophoresis. Lancet II (1970), 368
100. WRIGHT, R.,
R.W. McCOLLUM, G. KLATSKIN Australia Antigen in Acute and Chronic Liver Disease. Lancet II (1969), 117

Am Schlusse meiner Arbeit möchte ich nicht vergessen, Herrn Prof.
Dr. Dr. Meyer zum Büschenfelde für die Überlassung des Themas und
Herrn Chefarzt Dr. H. Bitz für die stets gutige Unterstützung herzlich-
sten Dank auszusprechen.

LEBENS LAUF

Als Tochter des Zahnarzteehepaares Dr. Walter Lohse und Dr. Ilse Lohse, geb. Buchwald, wurde ich, K a r i n, Maria Ehrke, geb. Lohse in Stralsund/Mecklenburg am 26.6.1937 geboren.

Nach achtjähriger Grundschulzeit besuchte ich ab 1952 die Hansa-Oberschule in Stralsund, wo ich im Jahre 1956 die Reifeprüfung bestand.

Im gleichen Jahr begann ich mein Medizinstudium an der Humboldt-Universität Berlin (Ost) und legte dort mein Physikum ab. Die Fortsetzung des Studiums erfolgte ab Mai 1960 an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster. Der Wechsel war bedingt durch die Flucht meiner Eltern aus der DDR.

Am 25. Januar 1962 bestand ich an der Universität Münster das medizinische Staatsexamen. Im gleichen Jahr heiratete ich den Ing. grad. Werner Ehrke. Wir haben eine 10-jährige Tochter.

Die Medizinalassistentenzeit leistete ich in Bad Kreuznach im St. Franziskastift ab und erhielt am 31. August 1964 die Bestallung als Arzt.

Bis zum 31.12.1965 war ich als Assistentin auf der inneren Abteilung des St. Franziska-stiftes bei Herrn Dr. H. Leimgardt beschäftigt.

Seit 1966 bin ich in der serologischen Abteilung des DRK-Blutspendedienstes Rheinland-Pfalz in Bad Kreuznach (Leitung: Herr Dr. H. Bitz) tätig.

